



# Impact d'un régime maternel hyperlipidique et d'un stress précoce sur la programmation du phénotype adulte

Amandine Lepinay

## ► To cite this version:

Amandine Lepinay. Impact d'un régime maternel hyperlipidique et d'un stress précoce sur la programmation du phénotype adulte. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0305 . tel-01153102

**HAL Id: tel-01153102**

**<https://theses.hal.science/tel-01153102>**

Submitted on 19 May 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Spécialité Neurosciences

Par **Amandine LEPINAY**

**Impact d'un régime maternel hyperlipidique et  
d'un stress précoce sur la programmation du  
phénotype adulte**

Sous la direction de :

**Muriel DARNAUDERY**

Soutenue le 17 Décembre 2014

Membres du jury :

<b>LAYE Sophie</b> , Directrice de recherche, INRA .....	Présidente
<b>DAUGE Valérie</b> , Directrice de recherche, CNRS .....	Rapporteuse
<b>MACCARI Stéfania</b> , Professeure, Université de Lille .....	Rapporteuse
<b>PIETROPAOLO Susanna</b> , Chargée de recherche, CNRS .....	Examinatrice
<b>THEODOROU Vassilia</b> , Professeure, Ecole d'ingénieurs de Purpan .....	Examinatrice
<b>DARNAUDERY Muriel</b> , Professeure, Université de Bordeaux .....	Examinatrice

## **Impact d'un régime maternel hyperlipidique et d'un stress précoce sur la programmation du phénotype adulte**

La période périnatale est une période critique lors de laquelle la qualité de l'environnement influence durablement le phénotype. Ainsi, l'adversité dans l'enfance affecte la santé mentale à l'âge adulte. Nos habitudes alimentaires se sont modifiées avec une augmentation de la consommation d'aliments gras. Ces changements altèrent l'environnement nutritionnel précoce, mais l'effet à long terme sur le cerveau est mal connu.

L'objectif de ma thèse était d'examiner, grâce un modèle animal, l'impact d'un régime maternel hyperlipidique (HL) modélisant le régime des sociétés occidentales et d'un stress de séparation maternelle sur la programmation du phénotype de la descendance adulte. Dans une 1<sup>ère</sup> étude, nous avons montré que le régime maternel HL entraîne des modifications métaboliques chez la descendance et vulnérabilise à l'émergence de déficits mnésiques si l'exposition au régime est maintenue. Dans une 2<sup>ème</sup> étude, nous avons exploré les effets combinés du régime maternel HL et d'un stress de séparation maternelle (3h/jour, postnatal jours 2 à 14). Le stress précoce augmente la motivation pour des aliments palatables et combiné au régime maternel HL exacerbe la prise de poids sous régime palatable. En revanche, le régime maternel HL protège la descendance des perturbations émotionnelles et mnésiques associées au stress précoce. Cet effet pourrait être sous-tendu par l'augmentation du comportement maternel sous régime HL et par l'atténuation des altérations développementales du cortex préfrontal des rats stressés. En conclusion, mon travail démontre que la nutrition et le stress interagissent en période périnatale et modifient à long terme le phénotype.

**Mots clés :** motivation, métabolisme, émotion, mémoire

## **Programming effects of maternal high-fat diet and early stress on adult phenotype**

The perinatal period is a critical period during which the quality of the environment has long lasting effects on adult phenotype. Early adversity in childhood has been associated with higher risks to develop neuropsychiatric disorders later in life. Nowadays, modern societies are characterized by a high consumption of fat. Although these changes also affect nutritional environment during development, the impact on brain functioning and behavior remains unknown.

The aim of my thesis was to examine the programming effects of maternal high-fat diet (HFD, western diet) and early stress on offspring phenotype. In the first part, we showed that maternal HFD leads to metabolic disturbances in adult offspring and sensitized to memory deficits if the HFD is maintained throughout life. In the second part, we explored the effects of the combination between maternal HFD and chronic maternal separation (3h/day, postnatal day 2 to 14). Maternal separation enhances motivation for palatable food and combined with maternal HFD exacerbates vulnerability to diet-induced obesity. In contrast, maternal HFD protects the offspring against the emotional and cognitive impairments induced by maternal separation. This protective effect of maternal HFD could be related to the increase of maternal care in stressed dams exposed to HFD and to the attenuation of neurodevelopmental alterations in the prefrontal cortex of stressed pups. In conclusion, my work demonstrates that stress and nutrition during early life interact and influence later adult phenotype.

**Keywords :** motivation, metabolism, emotion, memory

*« Tu ne pourras jamais rattraper  
La pierre après l'avoir lancée  
Les mots après les avoir dit  
L'occasion après l'avoir perdue  
Et le temps après qu'il soit passé »*

*Victor Betis*

## Remerciements

---

Il est toujours difficile de commencer des remerciements, surtout en pensant qu'ils symbolisent la fin de 3 années de thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier le **Dr Sophie Layé** qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et qui m'a fait l'honneur de présider le jury de thèse.

Mes remerciements s'adressent également au **Pr Stéfania Maccari**, au **Dr Valérie Daugé** ainsi qu'au **Pr Vassilia Théodorou** et au **Dr Susanna Pietropaolo** d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je leur exprime ici toute ma gratitude pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail.



Je voudrais exprimer ma reconnaissance à **Muriel Darnaudéry**, ma directrice de thèse, qui m'a accordé sa confiance il y a 3 ans, et qui m'a soutenue pendant cette thèse. Je te remercie pour ta chaleur, ta disponibilité et pour toutes les choses que j'ai pu apprendre à tes côtés.



Je tiens à remercier chaleureusement les membres passés et présents de la "Darnaudéry team", **Pauline Delage** (premier maillon de la chaîne),

**Marion Rincel**, qui reprend le flambeau (je te souhaite du courage et plein de bonnes choses pour la suite),

**Amandine Minni**, pour tes conseils et ta bonne humeur (notamment lors de nos chasses aux fèces en séance de sacrifice),

**Alexia Mathou** (Miaou miaou), **Lin Xia** (et ses talents

d'actrice) et **Marina-Romani-Perez**.

... ainsi que les stagiaires de cette "Darnaudéry team", qui ont grandement participé à la réalisation de ce travail: **Lucille Alonso**, **Marine Randé**, **Mélanie Bégorre** et **Mathilde Durand**.

Je tiens à remercier **Martine Cador** et **Stéphanie Caillé-Garnier** pour leur disponibilité et leurs précieux conseils sur le conditionnement opérant.



Il est maintenant temps de remercier mes petites fées qui ont tant fait que les mots manquent pour l'exprimer **Anne Laure-Dinel** (l'experte en mise en page), **Célia Fourier**, **Charlotte Rey** (coach squatteuse de coin de bureau) et **Agnès Aubert**. Mes petites fées, vous avez toujours su trouver les mots et vous m'avez permis d'aller au bout !

Mais aussi **Marie Pierre Manain**, **Alexandra Séré**, **Julie Carrez** et **Julie Sauvant** pour leur aide logistique, vestimentaire, "kleenexienne" et bien plus encore.



Merci à **Julien Bensalem**, mon copain de galère thésardienne. Nos moments partagés feront de Milan un des meilleurs souvenirs de ces 3ans.



Merci à **Yootana Janthakhin, Fred Tantôt, Helen Beyer** pour les matches de Badminton qui m'ont permis de décompresser.

Merci à **Aline Foury** pour ton aide au domptage de brb array tools mais surtout pour les parties de rigolade lors du tournage de tes chefs-d'œuvre cinématographiques (*Nutribreak, Bref* et *SOS chercheur en détresse*)

Merci à **Nathalie Castanon, Corinne Joffre** (alias " Mr Preskovitch"), **Véronique De Smedt** et **Agnès Nadjar** (fan de microglie n°1) pour tous les bons moments passés lors des lunches à la cafet'.

Je remercie les occupants passés et présents du bureau le plus cool du labo **Thomas Larrieu, Julie Lasselin, Julie Brossaud, Aurore Thomazeau, Gaby De Medeiros** et **Clémentine Bosch-Bouju**.


Merci à **Quentin Leyrolle, Fabien Ducrocq, Hortense Fanet, Chloé Lacabanne**, la relève des thésards.



Je remercie **Phillipe Birac, Mathieu Cadet** (un grand merci pour le sauvetage des mes données!) et **Cindy Testa** pour le soin apporté à mes bestioles.

Je remercie aussi les autres membres du laboratoire, **Marie-Pierre Moisan, Nathalie Arvy, Hélène Roumès, Claudine Tridon, Jean-christophe Helbing** (pour ton aide précieuse avec la PCR), **Pascal Barat, Jean-Benoit Corcuff, Annabelle Redonnet, Serge Alfes, Katia Touyarot, Pauline Lafenêtre, Pierre Trifillieff, Lucile Capuron, Guillaume Ferreira** (et ses "ça vaaaa?"), **Sylvie Vancassel, Sandra Dexpert, Vladimir Bogdanov, Catherine Noël-Suberville** et **Véronique Pallet**.

Je remercie **Charlotte Madore** (2<sup>ème</sup> fan de microglie et arracheuse de buisson à ses heures perdues), pour son sens de l'écoute, tous ses conseils et réponses à mes questions idiotes,

... Et Jean **Christophe Delpech** pour les craquages du soir sur des chansons d'anthologie 



Merci d'avoir été là tous les deux!

Je remercie aussi ma petite bande: **Marion, Eva, Jéhan, Mélanie, Hugo, et Kelly** pour votre aide à relâcher les soupapes de temps en temps et pour avoir réussi à me faire oublier les moments difficiles de la thèse. Vous n'imaginez pas comment votre soutien a été important.



Spartiates ! Quel est votre métier ?!

TOUS LES SPARTIATES : AOUIH ! AOUIH ! AOUIH !

Merci à **Aurélien** et à la gentille collaboration de son grain de folie qui m'a apporté le sourire pendant les temps d'écriture.

Merci aussi à **Manu** pour m'avoir encouragée à ne jamais baisser les bras et sans qui je ne serais pas là où j'en suis actuellement.

« *Les bons amis t'aident à retrouver des choses importantes lorsque tu les as perdues, ton sourire, ton espoir et ton courage* ».

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à **Mélissa** pour avoir pris soin de moi et pour m'avoir soutenu dans les moments difficiles. Je te remercie pour les efforts que tu as du faire au cours de cette thèse.

Pour finir, je remercie ma famille et en particulier mes parents pour avoir payé mes (longues) études et pour avoir été derrière moi quels que soient mes choix. En espérant vous rendre fiers.

# SOMMAIRE

---

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>10</b>
<b>I- Impact de l'adversité précoce chez l'adulte .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Impact de l'adversité précoce sur la vulnérabilité pathologique.....</b>	<b>10</b>
1.1.1. <i>Vulnérabilité neuropsychiatrique .....</i>	<i>10</i>
1.1.2. <i>Vulnérabilité aux troubles gastro-intestinaux.....</i>	<i>12</i>
1.1.3. <i>Comportement alimentaire et le phénotype métabolique.....</i>	<i>12</i>
<b>1.2. Conséquences neurobiologiques et endocrines de l'adversité précoce.....</b>	<b>14</b>
1.2.1. <i>Structure et fonction cérébrale .....</i>	<i>14</i>
1.2.2. <i>L'axe corticotrope .....</i>	<i>16</i>
1.2.3. <i>Le système immunitaire .....</i>	<i>18</i>
<b>1.3. Impact de l'adversité précoce sur les modifications épigénétiques.....</b>	<b>20</b>
<b>II- Modèle animal d'adversité précoce : la séparation maternelle .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1. Conséquences comportementales et physiologiques de la séparation maternelle.....</b>	<b>23</b>
2.1.1. <i>Impact sur les comportements émotionnels.....</i>	<i>23</i>
2.1.2. <i>Impact sur la vulnérabilité aux drogues .....</i>	<i>26</i>
2.1.3. <i>Impact sur les performances cognitives.....</i>	<i>27</i>
2.1.4. <i>Impact sur le comportement/motivation alimentaire et sur le phénotype métabolique.....</i>	<i>29</i>
2.1.5. <i>Impact sur la sphère viscérale .....</i>	<i>30</i>
<b>2.2 Conséquences neuroendocrines et neurophysiologiques à long terme de la séparation maternelle .....</b>	<b>32</b>
2.2.1. <i>Conséquences neuroendocrines .....</i>	<i>32</i>
2.2.2. <i>Conséquences neurobiologiques .....</i>	<i>34</i>



<b>2.3. Conséquences endocrines et neurobiologiques de la séparation maternelle pendant le développement .....</b>	<b>36</b>
--	-----------

### **III- Mise en évidence des interactions entre stress et nutrition..... 39**

#### **3.1. Etudes des liens entre stress et comportement alimentaire chez l'homme 39**

<i>3.1.1. Modifications du comportement alimentaire par le stress .....</i>	<i>39</i>
---	-----------

<i>3.1.2. Modulations des effets du stress par la nutrition .....</i>	<i>40</i>
---	-----------

#### **3.2. Etudes des liens entre stress et comportement alimentaire chez l'animal 42**

<i>3.2.1. Effets du stress sur le comportement alimentaire.....</i>	<i>42</i>
---	-----------

<i>3.2.2. Effets des régimes hyperlipidiques palatables sur le stress.....</i>	<i>44</i>
--	-----------

<i>α. Régime hyperlipidique : anxiogène et potentialisateur de la réponse au stress .....</i>	<i>44</i>
---	-----------

<i>β. Régime hyperlipidique : anxiolytique et atténuateur de la réponse au stress .....</i>	<i>46</i>
---	-----------

### **IV- Conséquences d'un environnement nutritionnel précoce hyperlipidique ..... 49**

#### **3.1. Bouleversements alimentaires et conséquences sur la programmation du phénotype .....49**

#### **3.2. Impact d'un régime précoce hyperlipidique chez l'animal .....50**

<i>3.2.1. Conséquences sur le phénotype métabolique.....</i>	<i>50</i>
--	-----------

<i>3.2.2. Conséquences sur le comportement/ motivation alimentaire .....</i>	<i>51</i>
--	-----------

<i>3.2.3. Conséquences sur la sphère cognitivo-émotionnelle.....</i>	<i>52</i>
--	-----------

#### **3.3 Conséquences neurobiologiques et neuroendocrines de l'exposition précoce à un régime hyperlipidique .....54**

## **OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE TRAVAIL .....56**

<b>RESULTATS.....</b>	<b>61</b>
<i>Partie I : .....</i>	<i>62</i>
<i>Impact d'un régime maternel hyperlipidique sur le phénotype comportemental et métabolique de la descendance adulte. ....</i>	<i>62</i>
<i>Partie II : .....</i>	<i>78</i>
<i>Impact du régime maternel hyperlipidique combiné au stress précoce sur la réponse métabolique à des challenges nutritionnels et la motivation alimentaire à l'âge adulte</i>	
<i>Partie III : .....</i>	<i>108</i>
<i>Impact du régime maternel hyperlipidique sur les effets délétères à long terme du stress précoce</i>	
<b>Discussion générale .....</b>	<b>146</b>
<b>I- Pertinence des modèles.....</b>	<b>148</b>
<b>II- Effets différentiels du régime maternel hyperlipidique en fonction du contexte environnemental.....</b>	<b>153</b>
<b>III- Mécanismes potentiels sous-tendant l'effet protecteur du régime maternel hyperlipidique contre les altérations induites par la séparation maternelle .</b>	<b>159</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>169</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>170</b>
<b>Liste des publications .....</b>	<b>172</b>
<b>References.....</b>	<b>175</b>

# **INTRODUCTION**

# Introduction

---

La période périnatale est une période critique, lors de laquelle, les facteurs environnementaux laissent une empreinte durable, suggérant ainsi un phénomène de « programmation précoce » du phénotype adulte. Ainsi, un environnement d'adversité lors de l'enfance affecte la santé mentale à l'âge adulte. Depuis un siècle, nos habitudes alimentaires se sont fortement modifiées avec une augmentation de la consommation d'aliments gras et sucrés. Ces changements nutritionnels touchent aussi les femmes enceintes et les jeunes enfants conduisant à une altération de l'environnement nutritionnel précoce. Cependant, l'effet à long terme sur le cerveau est mal connu. L'objectif de ma thèse était d'examiner, l'impact d'un régime maternel hyperlipidique modélisant le régime des sociétés occidentales et d'un stress de séparation précoce sur la programmation du phénotype de la descendance adulte.

Dans cette introduction, nous aborderons dans un premier temps, les conséquences de l'adversité pendant les phases précoces du développement sur le phénotype de l'enfant et de l'adulte. Puis, nous décrirons le modèle animal d'adversité précoce, la séparation maternelle, ainsi que ses conséquences comportementales, neuroendocrines et neurobiologiques. Dans la troisième partie, nous examinerons les interactions entre le stress et la nutrition, et en particulier les liens entre stress et nourriture palatable hyperlipidique. Et enfin dans une dernière partie, nous aborderons l'impact de la nutrition précoce hyperlipidique sur le phénotype adulte.

## I- Impact de l'adversité précoce chez l'adulte

### 1.1. Impact de l'adversité précoce sur la vulnérabilité pathologique

#### 1.1.1. Conséquences de l'adversité précoce sur la vulnérabilité neuropsychiatrique

L'activation aiguë du système de régulation du stress est un phénomène d'adaptation qui favorise les chances de survie, cependant l'exposition à des stress intenses ou chroniques peut perturber, de manière durable, les systèmes physiologiques, endocrines, immuns et nerveux.

De tels changements lors du développement pourraient perturber la maturation des circuits cérébraux et influencer la vulnérabilité pathologique à long terme (Heim and Nemeroff, 2001; Levine, 2005; Maccari et al., 2014; McEwen, 2007; Selye, 1976).

Il a été rapporté que 53% des adultes ont été exposés à des situations de stress avant l'âge de 18 ans, les plus communs étant le divorce parental, des violences familiales, des problèmes économiques, la mort d'un parent ou encore des négligences ou maltraitances (Dong et al., 2004; Green et al., 2010). Par commodité, nous regrouperons ces différentes situations de stress vécues pendant l'enfance sous le terme « d'adversité précoce ».

De nombreuses études montrent que l'adversité pendant l'enfance constitue un facteur de risque majeur du développement et de la persistance de troubles neuropsychiatriques à l'âge adulte. Ainsi, une augmentation des risques de dépression, de stress post-traumatiques, de troubles de l'attention et d'hyperactivité a été rapportée chez des enfants souffrant de maltraitances (Famularo et al., 1992; Pelcovitz et al., 1994). Par ailleurs, la dépression et les troubles anxieux sont plus représentés chez des adultes rapportant une histoire d'abus pendant l'enfance (Felitti et al., 1998; Kaufman, 1991; Mullen et al., 1996; Stein et al., 1996). Par exemple, des femmes avec une histoire d'abus sexuels et physiques pendant l'enfance, mais pas à l'âge adulte, présentent une augmentation des symptômes anxieux et dépressifs, et sont plus à risque de tentatives de suicide que des femmes sans histoire d'abus (McCauley et al., 1997). La perte d'un parent est aussi associée à une augmentation de la prévalence de dépressions bipolaires et unipolaires, de troubles anxieux, et ce, indépendamment de l'histoire familiale ou des prédispositions génétiques (Agid et al., 1999; Kendler et al., 1992). Il a été mis en évidence une relation dose dépendante entre la sévérité des expériences pendant l'enfance et la présence d'épisodes dépressifs ou de dépression chronique à l'âge adulte (Chapman et al., 2004). De plus, il a été montré des associations entre l'adversité précoce et la sévérité et l'évolution des symptômes de la schizophrénie (Lysaker et al., 2005; Read et al., 2005; Schenkel et al., 2005). Cette vulnérabilité neuropsychiatrique peut être mise en évidence par le fait que les personnes soumises à l'adversité pendant les phases précoces du développement présentent 3 fois plus de prescriptions d'antidépresseurs, d'anxiolytiques ou d'antipsychotiques, par rapport à des personnes sans histoire d'adversité (Anda et al., 2007).

Il est intéressant de noter que la manifestation ou l'aggravation de ces troubles neuropsychiatriques à l'âge adulte sont souvent reliées aux niveaux de stress des individus

(Hammen et al., 1992; Norman et Malla, 1994). Ainsi, il a été suggéré que l'adversité pendant l'enfance entraînerait une augmentation de la vulnérabilité au stress à l'âge adulte.

Par ailleurs, il a été mis en évidence que l'adversité précoce mène à une augmentation des conduites addictives. Plus précisément, elle est associée à une augmentation de la consommation d'alcool ou de drogues d'abus (Berry et Sellman, 2001; Conroy et al., 2009; Gil-Rivas et al., 1996; Harrison et al., 1989; Macleod et al., 2008; Rohsenow et al., 1988; Swift et al., 1996)

### *1.1.2. Conséquences de l'adversité précoce sur la vulnérabilité aux troubles gastro-intestinaux*

Le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII) est un trouble fonctionnel intestinal caractérisé par des altérations de la motilité intestinale, une hypersensibilité viscérale et des altérations des sécrétions intestinales (Ohman et Simren, 2010). Il se manifeste par des douleurs abdominales, un inconfort digestif et des modifications du transit intestinal. Le SII affecte 10-15% de la population totale dans les pays industrialisés (Saito et al., 2002), avec une prévalence deux fois plus importante chez la femme que chez l'homme (Mayer et al., 1999).

De nombreuses études ont montré que l'adversité précoce constitue un facteur de risque à l'émergence de troubles gastro-intestinaux, en particulier du SII, pour revue Chitkara et al. (2008). Il a ainsi pu être montré que les patients atteints de troubles gastro-intestinaux rapportent significativement plus d'expérience d'adversité pendant l'enfance (Halland et al., 2014). Par exemple, une proportion élevée de patients atteints du SII rapportent des abus physiques (Salmon et al., 2003), des mauvaises relations parentales ou la perte d'un parent pendant l'enfance (Hislop, 1979). D'autre part, une étude récente montre que parmi les différents types d'abus, l'abus émotionnel pendant l'enfance est le prédicteur le plus fort du SII à l'âge adulte (Bradford et al., 2012).

### *1.1.3. Conséquences de l'adversité précoce sur le comportement alimentaire et le phénotype métabolique*

Il existe une comorbidité entre troubles neuropsychiatriques et troubles du comportement alimentaire, *i.e* boulimie ou anorexie (Blinder et al., 2006; Braun et al., 1994;

Godart et al., 2002). De nombreux travaux soulignent que l'adversité précoce prédispose les individus à un comportement alimentaire pathologique. Ainsi, des maltraitances (Horesh et al., 1995; Welch et Fairburn, 1996), ou des problèmes relationnels avec les parents (Horesh et al., 1996) sont associés à une prévalence élevée de troubles alimentaires. Des femmes avec une histoire d'abus pendant l'enfance présentent des risques élevés d'addiction alimentaire (évaluée par une échelle : « Yale Food Addiction Scale ») (Mason et al., 2013). Cette addiction alimentaire pourrait en partie expliquer l'augmentation de la prévalence de l'obésité chez les individus exposés à l'adversité précoce.

En effet, de plus en plus d'études mettent en évidence que l'adversité précoce constitue un facteur de vulnérabilité dans l'émergence de troubles métaboliques à l'âge adulte. Des études menées chez l'enfant ont montré que le niveau de stress maternel est positivement, corrélé avec le risque, pour l'enfant, d'être en surpoids dans un environnement de « sécurité alimentaire » (Gundersen et al., 2011). Une étude similaire a montré que le niveau de stress parental est corrélé avec l'obésité infantile (Parks et al., 2012). Au-delà de l'impact chez l'enfant, l'adversité précoce peut aussi programmer la vulnérabilité aux troubles métaboliques à l'âge adulte. Ainsi, l'exposition à une grande variété de stress pendant les phases précoces de vie est corrélée avec l'indice de masse corporelle, chez des hommes, et ce, indépendamment des troubles neuropsychiatriques (Gunstad et al., 2006). A titre d'exemple, une histoire d'abus physiques ou sexuels pendant l'enfance est associée à une augmentation de la prévalence de l'obésité (Midei et al., 2013; Noll et al., 2007; Richardson et al., 2014) et/ou du diabète de type 2 (Rich-Edwards et al., 2010) à l'âge adulte. D'autres études ont permis de mettre en évidence que des expériences d'adversité considérées moins sévères, comme des conflits parentaux ou un divorce pendant la petite enfance ou l'adolescence, augmentent également le risque d'obésité (D'Argenio et al., 2009; Greenfield et Marks, 2009).

**En conclusion, l'adversité pendant l'enfance constitue un facteur de vulnérabilité dans l'émergence de troubles neuropsychiatriques, gastro-intestinaux et métaboliques à l'âge adulte. Nous allons maintenant aborder les conséquences de l'adversité précoce sur la structure et le fonctionnement du cerveau, ainsi que sur certains systèmes, comme le système endocrine ou immunitaire, qui pourraient sous-tendre les conséquences délétères de l'adversité précoce sur la prédisposition aux maladies de l'âge adulte.**

## **1.2. Conséquences neurobiologiques et endocrines de l'adversité précoce**

### *1.2.1. Conséquences de l'adversité sur la structure et la fonction cérébrale*

Nous allons nous focaliser sur les modifications de 3 structures clés connues pour être sensibles à l'adversité précoce : le cortex préfrontal, l'amygdale et l'hippocampe.

#### *Cortex préfrontal*

Le cortex préfrontal est une structure connectée avec de nombreuses régions corticales et sous corticales qui joue un rôle dans la régulation des processus cognitifs et émotionnels. Il a été mis en évidence des anomalies dans le cortex préfrontal dans le cas de stress post-traumatiques liés à des maltraitements (Carrion et al., 2009; De Bellis et al., 2002), de dépressions associées à des stress pendant l'enfance (Frodl et al., 2010), des abus physiques (Tomoda et al., 2009) ou des abus émotionnels précoces (van Harmelen et al., 2010). De manière plus spécifique, on observe chez des individus ayant subis des maltraitements physiques pendant l'enfance, une réduction du volume du cortex orbito-frontal qui est impliqué dans la prise de décision, la régulation émotionnelle et le comportement social. Ces altérations seraient être en partie responsables des difficultés sociales rencontrées par les victimes de stress précoce (Haller et al., 2014).

Des adultes ayant été élevés dans des institutions en Roumanie et exposés à de graves négligences, présentent une diminution du métabolisme du glucose dans le cortex préfrontal, suggérant ainsi une hypoactivité de cette zone par rapport à des sujets témoins (Chugani et al., 2001). Il a été proposé que ces différentes altérations structurales et fonctionnelles de la zone préfrontale résultent d'un retard de maturation causé par l'exposition à l'adversité précoce.

#### *Hippocampe*

L'hippocampe est une structure impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Les conséquences de l'adversité sur le volume de l'hippocampe ne sont pas claires. Des études montrent aucune modification du volume hippocampique chez des enfants exposés à l'adversité précoce (De Bellis et al., 2001; Woon and Hedges, 2008). Cependant, il a été



montré que l'adversité précoce entraîne une réduction du volume de l'hippocampe, chez des adolescents (Rao et al., 2010), suggérant ainsi que les altérations de l'hippocampe émergent plus tardivement dans la vie. Une étude longitudinale a voulu tester cette hypothèse. De Bellis et al. ont suivi des enfants avant la puberté et 20 ans plus tard, afin de voir si les altérations de l'hippocampe induites par l'adversité précoce pouvaient être mesurables avant l'adolescence (De Bellis et al., 2002). Les résultats n'ont pas permis de supporter cette hypothèse. Cependant, au moment du test, les participants n'étaient pas encore adultes. Des études ayant retardé le moment d'évaluation à l'âge adulte ont permis de mettre en évidence que les changements hippocampiques résultant de l'adversité précoce n'émergent qu'à l'âge adulte (Andersen et al., 2008; Vermetten et al., 2006; Vythilingam et al., 2002; Woon et Hedges, 2008).

Ces divergences concernant les effets de l'adversité précoce sur l'hippocampe peuvent être liées au moment d'évaluation ou à la période du développement pendant laquelle l'individu est exposé à l'adversité. Ces modifications hippocampiques retardées induites par l'adversité précoce pourraient résulter d'autres changements neurobiologiques ayant lieu pendant l'enfance, comme par exemple des modifications amygdaliennes.

### *Amygdale*

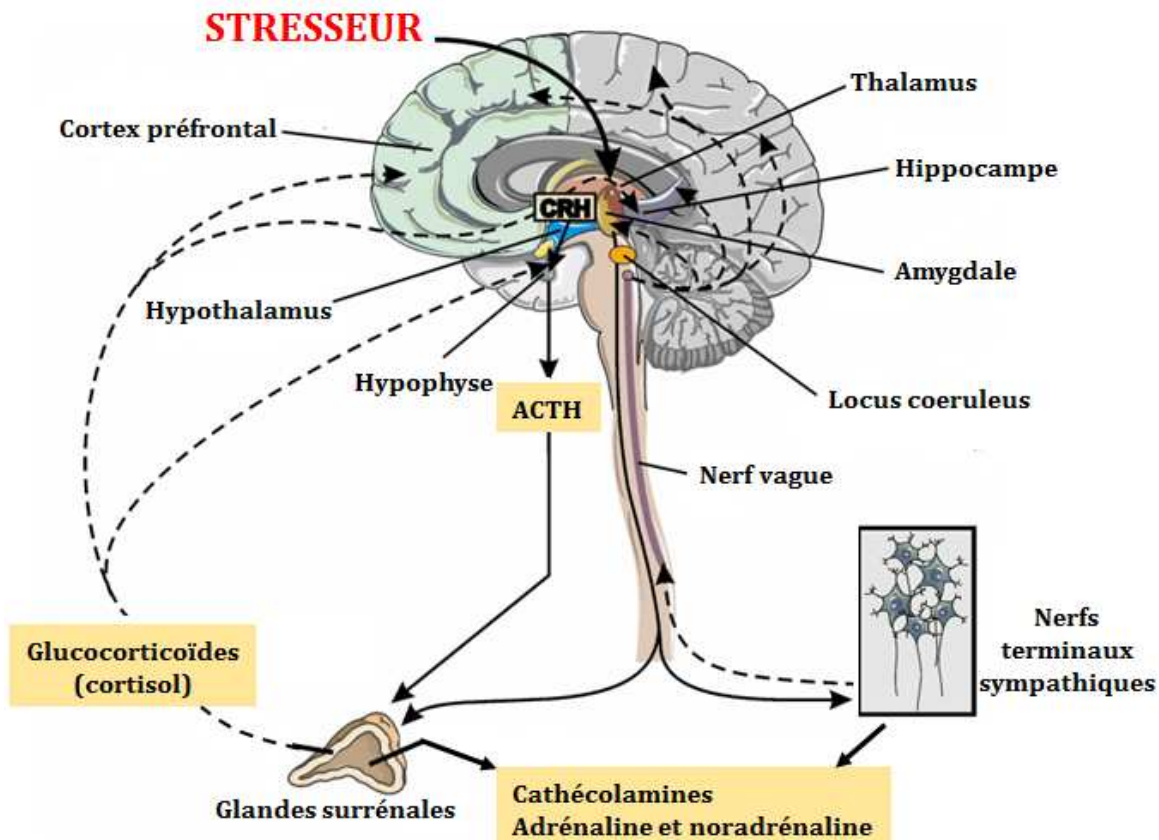
L'amygdale joue un rôle dans le traitement des informations et l'évaluation d'une potentielle menace, dans les comportements de peur, la régulation des processus émotionnels et la mémoire émotionnelle (Phelps et LeDoux, 2005).

Il a été mis en évidence une augmentation du volume de l'amygdale chez des enfants de 10 ans exposés à des cas de dépressions maternelles depuis la naissance, par rapport à des enfants témoins (Lupien et al., 2011).

On retrouve cette augmentation du volume amygdalien chez des enfants adoptés ayant vécu dans des orphelinats roumains (Driessen et al., 2000; Mehta et al., 2009; Schmahl et al., 2003; Tottenham et Sheridan, 2009). Il est intéressant de noter que les enfants ayant été adoptés plus tard, ont tendance à présenter une augmentation plus importante de l'amygdale, suggérant ainsi que le degré d'adversité est en lien étroit avec les altérations cérébrales. Par ailleurs, le fait que ces enfants aient été adoptés par des familles avec un statut socio-économique élevé, supporte l'idée que ces altérations de l'amygdale puissent être irréversibles (Malter Cohen et al., 2013).

### 1.2.2. Conséquences de l'adversité précoce sur l'axe corticotrope

L'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (ou axe corticotrope) est au cœur des réponses biologiques de stress et de résilience, de concert avec le système nerveux autonome et les processus comportementaux d'adaptation. La **figure 1** montre les principaux acteurs ainsi que le fonctionnement de l'axe corticotrope.



**Figure 1: Schéma de l'axe corticotrope (Moisan et Le Moal, 2012)**

Le stress active le circuit « systémique » qui constitue un relais direct entre les efférences viscérales et le noyau paraventriculaire (NPV). Ce circuit implique des projections du tronc cérébral : noradrénergiques du locus coeruleus et sérotoninergiques du noyau du raphé. Les stress psychogènes nécessitent une intégration sensorielle supérieure. Des afférences limbiques glutamatergiques (hippocampe et cortex préfrontal) et GABAergiques (amygdale) permettent d'inhiber ou de stimuler l'activité du NPV. Les neurones parvocellulaires du NPV libèrent la corticolibérine (CRH : corticotropin-releasing hormone) et l'arginine vasopressine (AVP), qui sont ensuite transportées, par l'intermédiaire du système porte hypophysaire, vers l'adénohypophyse. La CRH stimule l'expression du gène de la proopiomélanocortine (POMC) et la libération des peptides qui en dérivent : les lipotropines, l'endorphine et la corticotropine (ACTH : adénocorticotropine hormone). L'ACTH passe dans la circulation générale, jusqu'aux glandes surrénales pour stimuler la synthèse et la libération de glucocorticoïdes. L'innervation sympathique de la glande surrénale est également impliquée dans la stimulation du cortex surrénalien. Les glucocorticoïdes (hormones stéroïdes) agissent par l'intermédiaire de deux types de récepteurs intracellulaires : les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR ou de type I, forte affinité) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR ou de type II, faible affinité). Les glucocorticoïdes exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe corticotrope qui met en jeu les GR aux niveaux hypophysaire, hypothalamique et hippocampique.

Plusieurs études ont examiné l'impact de l'adversité précoce sur le fonctionnement de l'axe corticotrope, en situation basale et après un stress ou une stimulation pharmacologique. Des études ont rapporté une élévation des niveaux de base de cortisol chez l'enfant soumis à l'adversité précoce (Carrion et al., 2002; Cicchetti et Rogosch, 2001; De Bellis et al., 1999). Par ailleurs, des enfants élevés dans des orphelinats roumains, présentent une atténuation de la libération de cortisol suite à un stress (Carlson et Earls, 1997).

Il a été suggéré que cette hypoactivation de l'axe corticotrope en réponse à un stress, dans un contexte d'activation chronique neuroendocrine, soit due à un mécanisme compensatoire dans le rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope. Des tests pharmacologiques ont été développés afin de pouvoir tester cette hypothèse. Ainsi, le test DEX/CRH permet d'évaluer l'efficacité du rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope lors d'une stimulation pharmacologique. Lors du test, on administre de la dexaméthasone (DEX, glucocorticoïde de synthèse) suivi d'une administration de CRH, 24 heures après. Chez un sujet sain, la sécrétion de cortisol après CRH est supprimée par le prétraitement à la DEX. Chez un sujet dépressif, on observe un échappement aux effets de la DEX caractérisé par des taux élevés d'ACTH et de cortisol.

En réponse à ce test de challenge à la CRH, des enfants victimes d'abus sexuels présentent une atténuation de la libération d'ACTH malgré des taux de cortisol inchangés, suggérant ainsi une hypo-sensibilité à la CRH ou une augmentation de la sensibilité des récepteurs aux glucocorticoïdes impliqués dans le rétrocontrôle (Heim et al., 2000). Cependant, des enfants maltraités et ayant des troubles dépressifs présentent au contraire une augmentation des niveaux d'ACTH en réponse au test DEX/CRH ou un stress (Kaufman et al., 1997). Une des hypothèses expliquant ces résultats contradictoires est que l'élévation de l'activité de l'axe corticotrope est associée avec la présence concomitante d'un trouble neuropsychiatrique (Tarullo et Gunnar, 2006). Par exemple, deux études ont montré une augmentation du cortisol au cours de la journée chez des enfants maltraités présentant une dépression, mais pas d'effet chez les enfants maltraités ne présentant pas de dépression (Hart et al., 1996; Kaufman, 1991).

A l'âge adulte, tout comme chez l'enfant, les adultes exposés à l'adversité précoce présentent une activation chronique de l'axe corticotrope. Par exemple, des adultes dépressifs ayant vécu des expériences stressantes pendant l'enfance ont des taux élevés de CRH dans le liquide cérébro-spinal (Carpenter et al., 2009b). Les conséquences de cette élévation de CRH sont hétérogènes et sont modulées par la présence concomitante de psychopathologies. A titre

d'exemple, des adultes avec une histoire d'abus pendant l'enfance sans troubles neuropsychiatriques associés présentent une atténuation des réponses ACTH et cortisol à un stress de laboratoire ou après le test CRH/DEX, par rapport à des sujets sans histoire d'abus (Carpenter et al., 2009a). Ces résultats indiquent une hypo-sensibilité à la CRH et/ou une augmentation de la sensibilité des récepteurs aux glucocorticoïdes (Carpenter et al., 2009b). Cependant, les études menées chez des sujets adultes combinant histoire d'adversité précoce et troubles neuropsychiatriques ont montré des effets opposés. En effet, comme chez les enfants dépressifs, des adultes atteints de dépression et ayant vécu des maltraitances pendant l'enfance ont des taux d'ACTH et de cortisol plus élevés après un stress de laboratoire ou après le test CRH/DEX (Heim et al., 2008). Ces travaux suggèrent donc qu'une psychopathologie combinée à une histoire d'abus pendant l'enfance entraîne une hyperactivité de l'axe corticotrope, qui serait liée là encore à une hypersensibilité à la CRH et/ou à une réduction de la sensibilité des récepteurs aux glucocorticoïdes.

### *1.2.3. Conséquences de l'adversité précoce sur le système immunitaire*

Le système immunitaire est un système complexe assurant la protection contre les pathogènes et permettant le maintien de l'intégrité de l'individu. Il discrimine les molécules du 'soi' et du 'non-soi', ou antigènes. L'immunité innée, première ligne de défense, est activée suite à l'infiltration de pathogènes, et suffit à résoudre la majorité des infections, grâce aux cellules phagocytaires (monocytes, macrophages et neutrophiles), qui neutralisent les antigènes par phagocytose.

Les cellules de l'immunité innée (notamment les macrophages) reconnaissent les motifs moléculaires présents à la surface des agents pathogènes. Leur liaison aux récepteurs spécifiques des macrophages active les voies de signalisation intracellulaires contrôlant la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et la synthèse de cytokines (Janeway et Medzhitov, 2002). Parmi les cytokines, on retrouve principalement les interleukines (IL) et les facteurs de nécrose tumorale (TNF), les interférons (IFN) et les chimiokines (cytokines chimio-attractantes).

L'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, et le TNF $\alpha$  (pro-inflammatoires) modulent l'action des lymphocytes en favorisant leur production, leur maturation, leur différenciation et leur activation. L'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 sont impliquées dans la production des protéines comme la CRP (Protéine C-réactive ou C-reactive

protein). La réaction inflammatoire est ensuite régulée par l'activité de cytokines anti-inflammatoires, telles l'Il-4 et l'Il-10, qui inhibent la production des cytokines pro-inflammatoires par les monocytes et les macrophages.

De nombreuses études montrent que l'adversité affecte l'activité du système immunitaire.

Ainsi, des enfants exposés à des stress précoces présentent une augmentation des anticorps en réponse au virus de l'herpès1 (Shirtcliff et al., 2009). Par ailleurs, l'adversité pendant l'enfance a été associée avec une élévation des taux de CRP, un biomarqueur des processus inflammatoires (Danese et al., 2007; Pollitt et al., 2007; Taylor et al., 2006). Des maltraitances ou des traumatismes précoces prédisent les niveaux de fibrinogènes (une glycoprotéine impliquée dans l'activité inflammatoire), le nombre de cellules lymphocytaires (Danese et al., 2008), d'interleukine-6 (Carpenter et al., 2010; Carroll et al., 2011; Gouin et al., 2012; Pace et al., 2006) et les niveaux de NFκ-B (Nuclear Factor Kappa B) en réponse à un stress (Pace et al., 2006). Des résultats similaires ont été trouvés chez des individus élevés dans un contexte socio-économique défavorisé, avec notamment une augmentation des taux d'interleukine-6 et de NFκ-B (Miller et al., 2009). Cette augmentation de cytokines chez les personnes exposées à l'adversité précoce pourrait résulter d'une incapacité des récepteurs aux glucocorticoïdes à inhiber les voies de synthèse de cytokines.

De manière intéressante, l'activité du système immunitaire a été impliquée dans des processus qui sont altérés dans des cas d'adversité précoce.

Ainsi, l'activation chronique du système immunitaire est associée à des symptômes neuropsychiatriques, tels que la dépression (Capuron et al., 2004; Raison et al., 2006). Des altérations de la production de cytokines ont été rapportées dans les troubles du comportement alimentaire (Corcos et al., 2003) ou dans l'obésité (Lasselin et al., 2014). De plus, il a été suggéré que des perturbations du système immunitaire pourraient être impliquées dans la symptomatologie du syndrome de l'intestin irritable (Dinan et al., 2006; Ohman et Simren, 2010).

En résumé, l'adversité précoce entraîne des altérations cérébrales, ainsi que des perturbations des systèmes endocrines et immunitaires chez l'enfant qui peuvent persister jusqu'à l'âge adulte (voir Tableau 1).

**Tableau 1: Résumé des altérations cérébrales, endocrines et immunitaires chez des enfants et adultes exposés à l'adversité précoce** (adapté de Danese et al., 2014)

	ENFANTS	ADULTES
<b>Cerveau</b>	Cortex préfrontal: diminution du volume Altérations des fonctions exécutives	Cortex préfrontal: diminution du volume
	Amygdale: possibles augmentations du volume	Amygdale: possibles diminutions du volume.
	Hippocampe: pas de changement	Hippocampe: diminution du volume Déficits de mémoire déclarative.
	Déficits attentionnels, hyperactivité, altérations de la régulation émotionnelle	Dépression, anxiété, stress post traumatique, vulnérabilité aux drogues d'abus/alcool
<b>Axe corticotrope</b>	Augmentation des taux de base de cortisol.	Augmentation des taux de CRH de base
	Réponse au stress atténuée	Réponse cortisol atténuée (sans maladie mentale) ou augmentée (maladies mentales)
	Stimulation pharmacologique (test CRH/DEX): ACTH atténuée et cortisol normal mais augmentation de l'ACTH (si dépression associée)	Stimulation pharmacologique (test CRH/DEX): réponses ACTH et cortisol atténuées (sans maladie mentale) ou augmentées (maladies mentales)
<b>Système immunitaire</b>	Augmentation des niveaux d'inflammation	Augmentation des niveaux d'inflammation

### 1.3. Impact de l'adversité précoce sur les modifications épigénétiques

Les processus épigénétiques regroupent l'ensemble des modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes ne s'accompagnant pas de changements des séquences nucléotidiques. Ces processus épigénétiques peuvent être modulés par des facteurs environnementaux, aboutissant ainsi à des modifications d'expression des gènes. Des études montrent que l'adversité précoce entraîne des modifications épigénétiques de certains marqueurs, qui pourraient potentiellement sous-tendre les effets à long terme de l'adversité précoce. Les revues récentes de Lutz et Turecki (2014) et Vaiserman (2014) décrivent les différentes modifications épigénétiques associées à l'adversité précoce.

L'étude d'hippocampes de victimes de suicide a montré que le niveau de méthylation des sites CpG de l'exon du promoteur du gène codant le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) est plus élevé chez les individus ayant une histoire d'adversité précoce (McGowan et al., 2009). Les modifications épigénétiques ne concernent pas uniquement le tissu cérébral, mais peuvent également être observées dans les tissus périphériques. En effet, l'adversité précoce ou des violences pendant la période prénatale sont associées à une augmentation de la méthylation d'une région de l'exon du gène GR dans les leucocytes (Radtke et al., 2011; Tyrka et al., 2012). Par ailleurs, l'examen de la méthylation des cellules mononucléées de la moelle osseuse a révélé des associations entre la dépression maternelle prénatale et la méthylation de certains sites spécifiques du gène GR. En accord avec ce résultat chez l'adulte, il a été montré que le niveau de méthylation est corrélé avec le taux salivaire de cortisol chez des enfants de 3 mois exposés au stress prénatal, suggérant ainsi des connections entre les profils de méthylation et l'activité de l'axe corticotrope (Oberlander et al., 2008).

Bien qu'un grand nombre d'études se soient intéressées aux liens entre l'adversité précoce et les gènes impliqués dans l'axe corticotrope, bien moins ont examiné les modifications épigénétiques des gènes relatifs au système immunitaire ou au métabolisme. Cependant, quelques études basées sur l'examen du génome entier, ont montré qu'une grande population de gènes impliqués dans le métabolisme présente des profils de méthylation différents chez des individus exposés à des stress parentaux ou élevés dans des milieux socioéconomiques défavorables pendant l'enfance (Borghol et al., 2012; Essex et al., 2013). Par ailleurs, des analyses de la méthylation du génome entier chez des enfants avec ou sans adversité précoce a révélé que plusieurs gènes impliqués dans le système immunitaire, notamment dans la production de cytokines, présentent des modifications de méthylation (Essex et al., 2013).

**Ces études suggèrent que des processus épigénétiques, résultant de l'adversité précoce, pourraient sous-tendre les perturbations à long terme de l'axe corticotrope ou du système immunitaire, et influencer la vulnérabilité future aux maladies de l'âge adulte.**

La **figure 2** regroupe les différentes altérations du phénotype induites par l'adversité précoce.



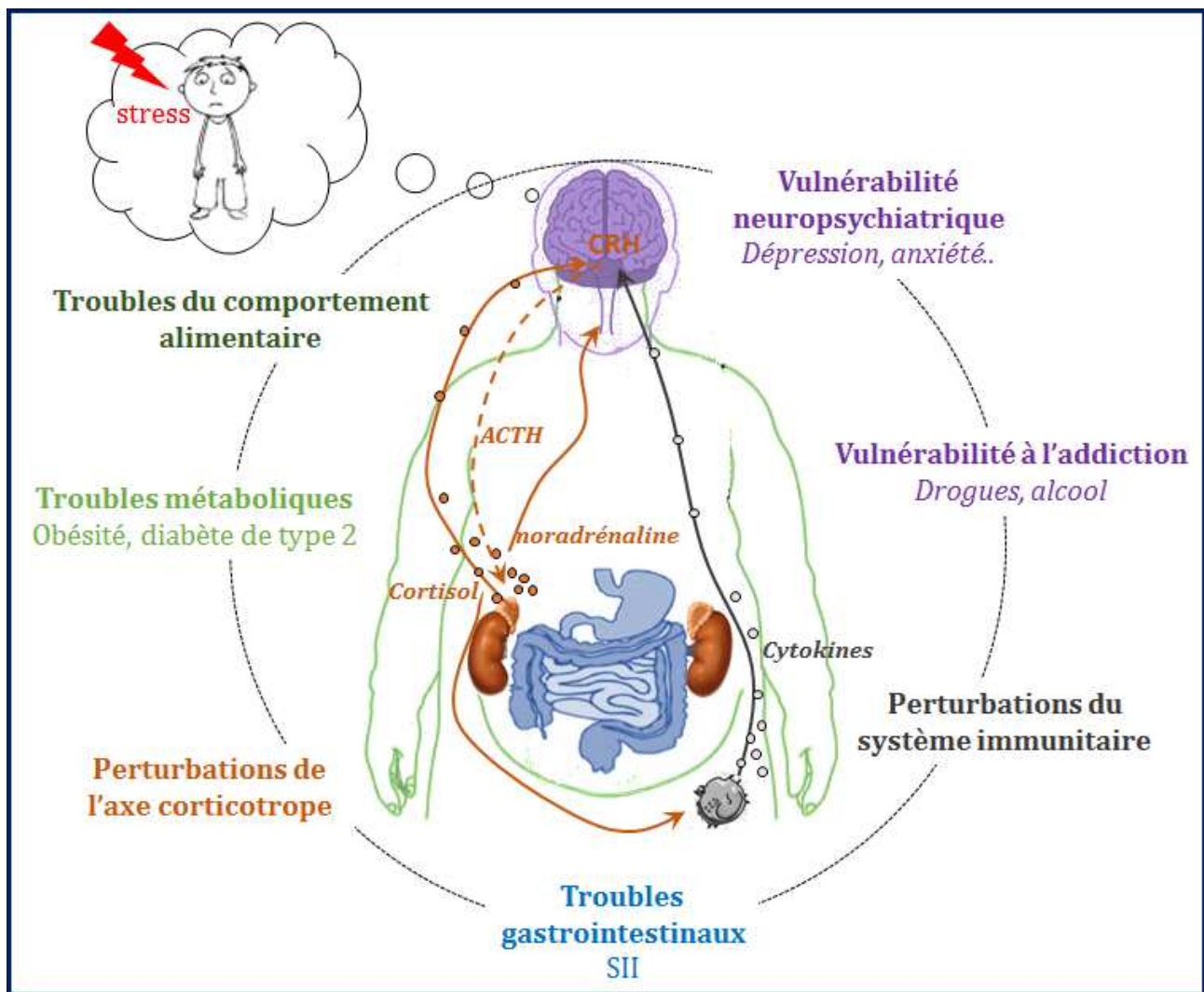


Figure 2: Schéma récapitulatif des conséquences de l'adversité précoce sur la vulnérabilité pathologique à long terme.

En conclusion, nous venons de voir des individus ayant vécu des expériences d'adversité pendant l'enfance présentent des altérations neurobiologiques à long terme et ont plus de risques de développer des troubles neuropsychiatriques et métaboliques à l'âge adulte, suggérant ainsi que le stress pendant les périodes précoces du développement peut programmer le phénotype à l'âge adulte. Cependant, les mécanismes sous-tendant cette programmation sont difficiles à étudier chez l'homme. Les modèles animaux deviennent alors des outils intéressants pour investiguer les processus mis en jeu.



## **II- Modèle animal d'adversité précoce : la séparation maternelle**

Les travaux pionniers de Levine et Denenberg puis de Meaney, et Plotsky ont montré que des perturbations de l'environnement précoce produisent des altérations à long terme sur le comportement émotionnel et la réponse au stress (Champagne et al., 2003a; Chapillon et al., 2002; Cirulli et al., 2003; Maccari et al., 2014; Meaney, 2001; Newport et al., 2002; Sanchez et al., 2001; Weaver et al., 2002).

Les modèles de séparation ou privation maternelle correspondent à des séparations mère-petits pendant des durées relativement courtes (Ader, 1968; Levine, 1966; Pryce et al., 2003; Vallee et al., 1999; Vallee et al., 1997; Wilber et al., 2009) ou prolongées (3-6h) (Lippmann et al., 2007; Plotsky et Meaney, 1993) au cours des premières semaines de vie (1-3 semaines). La séparation maternelle peut avoir lieu de manière répétée au cours du développement mais il existe aussi des paradigmes de séparations aiguës pendant 24h (Rosenfeld et al., 1992; Suchecki et al., 1993a). Les différents modèles ainsi que leurs différents effets sont décrits dans la revue de Lehman et Feldon (2000). Le protocole le plus utilisé est celui de séparations quotidiennes de 3h entre le 2<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour suivant la naissance (Plotsky et Meaney, 1993). La séparation maternelle induit différents degrés de stress chez le raton et la mère, en fonction des protocoles utilisés. La mère peut être séparée de la portée et placée dans une nouvelle cage, laissant les petits sans soin maternel mais ensemble dans un environnement familial. L'ensemble de la portée peut aussi être transféré dans un nouvel environnement, ce qui combine le manque de soin maternel et la privation de l'environnement familial. Enfin, les petits peuvent être séparés de manière individuelle, aboutissant ainsi à un isolement en plus de la séparation maternelle.

### **2.1. Conséquences comportementales et physiologiques de la séparation maternelle**

#### *2.1.1. Impact de la séparation maternelle sur les comportements émotionnels*

La vulnérabilité neuropsychiatrique est impossible à mesurer chez l'animal. Les outils disponibles pour évaluer la sphère émotionnelle se limitent majoritairement à des tests peu

éthologiques mais ayant une bonne validité prédictive, à savoir une bonne sensibilité aux traitements pharmacologiques (anxiolytiques, antidépresseurs) utilisés en psychiatrie.

Un test couramment utilisé pour mesurer le comportement de type anxieux chez l'animal est le labyrinthe en croix surélevé (Pellow et al., 1985). Ce test est basé sur la peur innée, des rongeurs, pour les espaces ouverts et leur préférence pour des endroits noirs et fermés. Un rat qui aura tendance à passer moins de temps et faire moins de visites des bras ouverts (espace ouvert) comparé aux bras fermés (espace protégé) sera désigné comme plus anxieux (Walf and Frye, 2007). En effet, des traitements avec des anxiolytiques augmentent l'exploration des bras ouverts dans ce test. Des rats exposés à des séparations maternelles quotidiennes de 3h pendant les premières semaines après la naissance passent moins de temps dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevée, indiquant ainsi une augmentation du comportement de type anxieux (Huot et al., 2001; Kalinichev et al., 2002b; Lee et al., 2007; Salzberg et al., 2007).

En lien avec ces études, la séparation maternelle augmente les comportements de type anxieux, dans le test de l'arène ouverte (open-field). Dans ce test, le rat est placé au centre d'un espace ouvert entouré de murs, empêchant sa fuite. Les rongeurs, n'appréciant pas les espaces ouverts, l'exposition à un nouvel environnement anxiogène va aboutir à une faible exploration du centre de l'arène. Des anxiolytiques augmentent le nombre d'entrées au centre de l'arène (Prut et Belzung, 2003), et le temps passé dans le centre de l'arène ouverte est généralement utilisé comme index d'anxiété de l'animal (Lister, 1990; Walsh et al., 1976). Des rats adultes qui ont été exposés à la séparation maternelle, font moins d'entrées et passent moins de temps au centre de l'arène ouverte (Caldji et al., 2000; Francis et al., 2002; Lambas-Senas et al., 2009). Cependant, dans certaines études, aucune différence de comportements de type anxieux dans le test de l'arène ouverte, n'a été trouvée entre des témoins ou des rats séparés précocement, pendant la période juvénile (Farkas et al., 2009; Zimmerberg and Kajunski, 2004) ou l'âge adulte (Eiland and McEwen, 2012). Cependant, de manière intéressante, il a été montré qu'un stress potentialise ces comportements de type anxieux chez des rats exposés à la séparation maternelle (Eiland et McEwen, 2012; Marais et al., 2008).

Les divergences de résultats concernant les mesures comportementales peuvent être liées à des différences d'effets sur l'axe corticotrope. En effet, les rats exposés à la séparation maternelle qui présentent des comportements de type anxieux ont aussi la particularité de

libérer plus de corticostérone après stress (Aisa et al., 2007; Francis et al., 2002; Kalinichev et al., 2002a). D'autre part, les rats qui ne présentent aucune différence du comportement de type anxieux, ne présentent pas non plus d'hyperactivité de l'axe corticotrope (Eiland et McEwen, 2012).

Le test de la nage forcée développé par Porsolt (Porsolt et al., 1977) consiste à mettre l'animal dans un cylindre rempli d'eau pendant 2 sessions successives. Lors de la seconde exposition, l'animal augmente son comportement d'immobilité. De nombreux travaux montrent que la séparation maternelle est associée à une augmentation du temps d'immobilité et une diminution du temps de nage chez l'animal adulte (Lambas-Senas et al., 2009; Lee et al., 2007; MacQueen et al., 2003; Veenema et al., 2007). Cependant, d'autres études ne montrent aucun effet de la séparation dans les comportements de type dépressif dans ce test (Marais et al., 2008; Mourlon et al., 2010; Ruedi-Bettschen et al., 2005b). Il semble que ces divergences s'expliquent, ici, par des différences des souches utilisées.

Les comportements de type dépressifs peuvent aussi être évalués grâce au test de préférence au sucrose. Cependant, là encore, les résultats divergent. En effet, il a été montré que la séparation maternelle diminue la préférence pour le sucrose (Aisa et al., 2007; Huot et al., 2001), l'augmente (Michaels et al., 2007; Mourlon et al., 2010) ou ne la modifie pas (Uchida et al., 2010). Ces divergences peuvent s'expliquer par les différences de protocoles de séparation maternelle utilisés.

Etant donné que le stress chronique, en tant que modèle de dépression, diminue la consommation de sucrose, il a été proposé que la cette diminution de la préférence pour le sucrose reflète un état d'anhédonie (Willner et al., 1987). Ainsi, les études montrant une diminution de la consommation de sucrose, ont conclu que la séparation maternelle augmente les comportements de type dépressif. Cependant, il est important de noter que la mesure de la consommation de sucrose peut être apparentée à des processus de recherche de la récompense. Ainsi, l'augmentation de la consommation de sucrose peut être interprétée par une plus grande sensibilité à ses propriétés hédoniques, qui serait en accord avec les données de la littérature indiquant que la séparation maternelle augmente la vulnérabilité aux drogues d'abus.

### *2.1.2. Impact de la séparation maternelle sur la vulnérabilité aux drogues*

Les effets de la séparation maternelle sur la prise de drogues d'abus ont été décrits dans différentes revues (Meaney et al., 2002; Moffett et al., 2007; Roman et Nylander, 2005). L'addiction aux drogues est évaluée grâce à différents paradigmes (Ahmed, 2010; Deroche-Gamonet et al., 2004; Sanchis-Segura et Spanagel, 2006).

L'auto-administration, qui permet de mesurer la motivation pour la prise de drogues, est communément employée parce qu'elle permet de mimer les comportements de consommation chez l'homme. La sensibilisation comportementale réfère à l'augmentation de l'effet comportemental induite par l'administration de la même dose de drogue.

Il a été montré que la séparation maternelle altère l'activité locomotrice induite par la cocaïne (Brake et al., 2004; Kikusui et al., 2005) ou l'amphétamine (Meaney et al., 2002). Par ailleurs, l'auto-administration de cocaïne est augmentée chez des animaux exposés à la séparation maternelle (Kosten et al., 2005; Lynch et al., 2005). La séparation maternelle augmente aussi la prise d'opioïdes (Naudon et al., 2013; Vazquez et al., 2006; Vazquez et al., 2005). En plus de la sensibilité aux drogues, la séparation maternelle influence la consommation d'alcool. Chez le rongeur, cette consommation d'alcool peut être évaluée grâce à différents paradigmes (pour revue (Becker, 2013)). Le plus commun des protocoles inclut un libre choix entre un biberon d'eau et un biberon d'alcool dans la cage d'élevage, pendant une période restreinte ou en continu. Malgré la variation des souches ou des protocoles utilisés, il a été montré que des animaux exposés à la séparation maternelle consomment significativement plus d'alcool par rapport à des rats exposés au « handling » (Jaworski et al., 2005; Roman et al., 2005; Roman et Nylander, 2005). Cependant les effets de la séparation maternelle sur la consommation volontaire d'alcool ne sont pas toujours retrouvés dans le cas de comparaison avec des témoins non manipulés (Jaworski et al., 2005). Ploj et al., ont mis en évidence une augmentation de la consommation d'alcool chez des rats exposés à la séparation maternelle en comparaison des témoins non manipulés ou soumis au « handling », mais seulement dans une sous-population de « répondeurs » qui initient et maintiennent leur consommation d'alcool (Ploj et al., 2003b).

De manière intéressante, Huot et al., (2001) ont montré que la consommation d'alcool chez les rats exposés à la séparation maternelle est positivement corrélée avec les taux de corticostérone après stress et négativement corrélée avec le temps passé dans les bras ouverts

du labyrinthe en croix surélevée. Ceci suggère des relations étroites entre les comportements de type anxieux, la réponse endocrine au stress et la consommation d'alcool.

### *2.1.3. Impact de la séparation maternelle sur les performances cognitives*

Les manipulations de l'environnement précoce peuvent aussi bien augmenter, diminuer ou ne pas avoir d'effets sur les capacités d'apprentissage et de mémoire. Ces divergences résultent des variations des procédures de séparation maternelle, ou des tests utilisés pour les évaluer. Par ailleurs, les différences de souches ainsi que le sexe des animaux rentrent en compte dans les effets de la séparation maternelle sur les performances cognitives. La vaste majorité des études rapportant des effets des manipulations précoces utilisent des tâches mesurant la mémoire spatiale ou relationnelle.

Dans le test du labyrinthe aquatique, l'animal doit nager pour rejoindre l'emplacement où la plate-forme se trouvait pendant les phases d'apprentissage. D'autres tâches comme la mémoire sociale ou la reconnaissance d'objets exploitant la propension des animaux à explorer de nouveaux objets, endroits ou congénères, peuvent aussi être utilisées pour évaluer la mémoire. Quelques-unes de ces tâches nécessitent des privations alimentaires ou hydriques pour motiver l'animal à explorer le labyrinthe. D'autres tâches exposent les animaux à des « stressseurs », comme de nager dans le labyrinthe aquatique de Morris ou d'être placé dans un nouvel environnement. En règle générale, la séparation maternelle induit des déficits mnésiques chez les animaux à l'âge adulte. Le **tableau 2** regroupe quelques résultats obtenus dans les études examinant les effets de la séparation maternelle sur les performances cognitives, dans le labyrinthe aquatique de Morris le labyrinthe radial, ou dans des tâches de reconnaissance sociale ou reconnaissance d'objets.

Par ailleurs, des rats exposés à la séparation maternelle présentent des perturbations de la mémoire dans une tâche de reconnaissance d'objet temporelle, impliquant principalement le cortex préfrontal (Baudin et al., 2012; Lejeune et al., 2013).

La séparation maternelle peut aussi entraîner des déficits mnésiques dans d'autres tâches comme le conditionnement de la peur, l'évitement passif, l'aversion gustative conditionnée, etc. Les effets de la séparation maternelle sur les performances d'apprentissage et de mémoire sont résumés dans la revue de Kosten et al. (2012).

Test	Procédure	Souche	Age	Résultats	Reference	
Labyrinthe aquatique	sép. Mat 3h/j (J2-21)	Wistar	J60-75	apprentissage (n.s), ↘ rétention (24h de délai)	Aisa et al., 2009	
	sép. Mat 3h/j (J2-21)	Wistar	3 mois	apprentissage (n.s), ↘ rétention (24h de délai)	Solas et al., 2010	
	sép. Mat 3h/j (J2-21)	Wistar	18 mois	apprentissage (n.s), ↘ rétention (24h de délai)	Solas et al., 2010	
	sép. Mat 3h/j (J2-14)	SD	j61-75	apprentissage (n.s), ↘ rétention (24h de délai)	Hui et al., 2011	
	sép. Mat 3h/j (J2-21)	Wistar	J60-75	apprentissage(n.s), ↘ rétention (24h de délai),	Aisa et al., 2007	
	sép. Mat 6h/j (J15-21)	Long Evans	J88-98	↘ apprentissage, ↘ rétention (délai de 24h)	Frisone et al., 2002	
	sép. Mat 1h/j (J2-9)	SD	J80-85	↘ (délai de 24h)	Huang et al., 2002	
	sép. Mat 1h/j (J2-9)	SD	J50-55	n.s	Lai et al., 2006	
	sép. Mat 3h/j (J1-14)	Long Evans	J80	n.s (48h de délai)	Baudin et al., 2012	<i>n.s : non significatif</i>
	sép. Mat 3h/j (J2-14)	Wistar	J65-80	apprentissage (n.s), ↘ rétention	Simoes do Couto et al., 2012	
	sép. Mat 3h/j (J1-21)	Wistar	J56	n.s	Xiaofang et al., 2013	
	sép. Mat 3h/j (J1-10)	Wistar	J100	apprentissage (n.s), ↘ rétention (24h de délai)	Mello et al., 2009	
	sép. Mat 3h/j (J2-14)	Long Evans	J60-75	n.s (apprentissage)	Huot et al., 2002	
Labyrinthe radial	sép. Mat 6h/j (J15-21)	Long Evans	3 mois	↘ mémoire de travail	Sandstrom, 2005	
	sép. Mat 6h/j (J15-21)	Long Evans	3 mois	↘ mémoire de travail	Sandstrom et Hart, 2005	
Reconnaissance d'objet	sép. Mat 3h/j (J2-21)	Wistar	J60-75	↘ (1h de délai)	Aisa et al., 2007	
	sép. Mat 3h/j (J1-10)	Wistar	J100-120	↘ (24h de délai)	Benetti et al., 2009	
	sép. Mat 1h/j (J2-9)	SD	?	↘ (24h de délai) n.s (3h)	Kosten et al., 2007	
	sép. Mat 3h/j (J1-15)	Wistar	3 mois	↘ (24h de délai) n.s (1,5h)	Martins de Lima et al., 2011	
	sép. Mat 3h/j (J2-21)	Wistar	J60-75	↘ (1h de délai)	Solas et al., 2010	
	sép. Mat 3h/j (J2-21)	Wistar	18 mois	↘ (1h de délai)	Solas et al., 2010	
	sép. Mat 3h/j (J1-14)	Long evans	J68	↘ (1h de délai)	Mourlon et al., 2010	
Reconnaissance sociale	sép. Mat 3h/j (J1-10)	Wistar	J100-120	↘ (24h de délai)	Benetti et al., 2009	
	sép. Mat 3h/j (J1-14)	Wistar	5sem.	n.s (1h de délai)	Lukas et al., 2011	
	sép. Mat 3h/j (J1-14)	Wistar	16 sem.	↘ (1h de délai), n.s (30min de délai)	Lukas et al., 2011	
	sép. Mat 3h/j (J1-14)	Wistar	3 mois	↘ (24h de délai)	Carvalho et al., 2014	
	sép. Mat 3h/j (J2-15)	Wistar	2,5 mois	↘ (5min de délai)	Huslof et al., 2010	

#### *2.1.4. Impact de la séparation maternelle sur le comportement/motivation alimentaire et sur le phénotype métabolique*

##### *Comportement/motivation alimentaire*

Malgré les données épidémiologiques, chez l'homme, montrant que l'adversité précoce prédispose aux troubles du comportement alimentaire et aux troubles métaboliques, très peu d'études ont examiné ces paramètres dans le modèle de séparation maternelle.

Cependant, quelques travaux montrent que la séparation maternelle pendant la période néonatale peut avoir des conséquences sur le comportement alimentaire chez l'animal à l'âge adulte. Si en condition basale, la séparation maternelle semble diminuer (Iwasaki et al., 2000) ou augmenter (Bernardi et al., 2013) la prise alimentaire, il a été montré qu'elle potentialise les effets du stress sur la prise alimentaire. En effet, il a été observé que la séparation maternelle ou l'isolement social seuls n'étaient pas suffisant pour affecter le comportement alimentaire, mais que la combinaison des deux augmentait la prise alimentaire ainsi que la prise de poids (Ryu et al., 2009). De plus, des rats adolescents soumis à la séparation maternelle présentent une hyperphagie en réponse à des alternances de privation/ ré-alimentation, processus pouvant s'apparenter à un stress (Ryu et al., 2008). Par ailleurs, le type d'aliment proposé semble avoir des effets sur la consommation alimentaire. Ainsi, des femelles soumises à la séparation maternelle augmentent leur consommation lorsqu'elles sont confrontées à une nourriture palatable à l'âge adulte (McIntosh et al., 1999).

Une étude sur la motivation alimentaire a mis en évidence une diminution des réponses opérantes pour de la nourriture chez des rats exposés à la séparation maternelle par rapport à des rats soumis au « handling » (Zellner et Ranaldi, 2006). Néanmoins, d'autres travaux ne montrent aucun effet de la séparation maternelle sur la motivation pour le sucre (Ruedi-Bettschen et al., 2005a; Shalev and Kafkafi, 2002).

##### *Phénotype métabolique*

Par ailleurs, les effets de la séparation maternelle sur le poids des animaux divergent selon les études. En effet, il a été montré une diminution (McIntosh et al., 1999), une augmentation (Bernardi et al., 2013) ou aucun changement du poids (da

Silva et al., 2014; Iwasaki et al., 2000; Kim et al., 2005; Yoo et al., 2011) chez des rats stressés précocement par rapport à des animaux témoins non manipulés. Des augmentations transitoires du poids peuvent être observés au sevrage mais elles ne persistent pas à l'âge adulte (Kim et al., 2005; Ryu et al., 2009). Au niveau des facteurs circulants métaboliques, il a été rapporté, chez des femelles exposées à la séparation maternelle, une diminution des taux plasmatiques d'insuline mais aucune modification des taux de leptine, d'adiponectine, de glucose, des triglycérides ou du cholestérol (Paternain et al., 2012). Dans cette étude, ces femelles ont été exposées à un régime obésogène à l'âge adulte. L'exposition au régime obésogène induit de nombreuses altérations métaboliques, mais aucune d'entre elles n'est modifiée par la séparation maternelle. La séparation maternelle induit même une diminution de l'accumulation de tissu adipeux périovarien induite par l'exposition au régime obésogène.

#### *2.1.5. Impact de la séparation maternelle sur la sphère viscérale*

##### *Perméabilité intestinale*

La séparation maternelle induit une augmentation immédiate du passage de macromolécules à travers la muqueuse colique associée à une augmentation du nombre de bactéries pénétrant dans l'épithélium, traduisant ainsi une augmentation de la perméabilité intestinale (Gareau et al., 2006; Moussaoui et al., 2014). De plus, il a été montré qu'un stress modéré, à l'âge adulte, augmente l'internalisation de macromolécules au travers de l'épithélium chez les rats exposés à la séparation maternelle (Soderholm et al., 2002). En effet, d'autres études ont montré que la séparation maternelle induit des altérations à long terme de la perméabilité paracellulaire intestinale (Barreau et al., 2004a; Barreau et al., 2006; Barreau et al., 2004c; Moussaoui et al., 2014) qui participeraient à l'augmentation de la perméabilité.

##### *Sensibilité viscérale et motilité*

Par ailleurs, il a été montré que des rats exposés à la séparation maternelle présentent une hyperalgésie viscérale ainsi qu'une augmentation de la motilité intestinale en réponse à un stress (Barreau et al., 2004b; Coutinho et al., 2002; Rosztoczy



et al., 2003). En effet, le nombre de fèces, comme index de la motilité intestinale, est augmenté chez les rats exposés à la séparation maternelle. De plus, il a été mis en évidence que la séparation maternelle est associée à une hyperalgésie en réponse à une distension colorectale (Gosselin et al., 2010; O'Mahony et al., 2008; Schwetz et al., 2005; Tjong et al., 2010). Cette procédure consiste à induire une distension colorectale à l'aide d'un ballon, et de mesurer les contractions abdominales de l'animal, comme index de la douleur viscérale. De manière intéressante, cette hypersensibilité viscérale en réponse à une distension colorectale est plus importante chez les femelles (Rosztoczy et al., 2003). Ce résultat peut être mis en parallèle de la prévalence plus élevée du syndrome de l'intestin irritable chez les femmes (Mayer et al., 1999).

### *Modification du microbiote intestinal*

Très peu d'études se sont intéressées aux effets de la séparation maternelle sur le microbiote intestinal. Cependant, il a pu être montré que le stress précoce chez le primate non humain modifie la composition du microbiote intestinal. Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat exposés à la séparation maternelle pendant la période juvénile et à l'âge adulte (Garcia-Rodenas et al., 2006; O'Mahony et al., 2009). A titre d'exemple, il a été montré que des rats exposés à la séparation maternelle présentent une augmentation du nombre de bactéries aérobies et anaérobies dans le colon. Ces changements de composition du microbiote intestinal pourraient résulter des effets de la séparation maternelle sur la muqueuse intestinale.

**Tableau 3 : Conséquences de la séparation maternelle sur la sphère viscérale**  
(tiré de Barreau et al., 2007)

Altérations induites par la séparation maternelle		Référence
Fonction de la barrière gastrointestinale:	↗ de la perméabilité paracellulaire	Barreau et al., 2007 a,b; Gareau et al., 2007a,b; Piche et al., 2009
Motilité gastro-intestinale:	↗ du transit colonique	Sadik et al., 2010; Holmes et al., 2005; O'mahony et al., 2009;
Sensibilité viscérale :	↗ de la douleur à la distension colorectale	Countinho et al., 2002; Chung et al., 2007a,b; Drosman et al., 2009
Système immunitaire:	Susceptibilité accrue à l'inflammation après stress	Varghese et al., 2006; Veenema et al., 2008; Cremon et al., 2009,
Microbiote entérique:	Modification du microbiote intestinal	Garcia-Rodenas et al., 2006; O'Mahony et al., 2009
Neurotransmission cerveau-intestin:	↗ des niveaux monoaminergiques après distension colorectale	Dunlop et al., 2005; Ren et al., 2007

### *Mécanismes potentiels*

Parmi les mécanismes potentiels, le NGF, la CRH (Barreau et al., 2004a; Gareau et al., 2006; Soderholm et al., 2002) et les mastocytes (Barreau et al., 2004b) participeraient à l'induction et au maintien des dysfonctionnements viscéraux induits par la séparation maternelle. En effet, il a été mis en évidence que l'administration (*i.p*) d'antagonistes des récepteurs au CRF bloque les effets de la séparation maternelle sur la perméabilité intestinale, la translocation bactérienne et l'hypersensibilité viscérale (Barreau et al., 2007; Gareau et al., 2006; Million et al., 2006; Schwetz et al., 2005; Soderholm et al., 2002). De même que l'administration d'anticorps anti-NGF avant chaque séparation maternelle contrecarre l'hypersensibilité viscérale en réponse à une distension colorectale ainsi que l'augmentation de la perméabilité intestinale, induites par la séparation maternelle (Barreau et al., 2004a; Barreau et al., 2007). La CRH, *via* le récepteur CRF-R1, promeut la libération de NGF par les mastocytes, induisant, par la suite, une augmentation de la perméabilité intestinale (Barreau et al., 2007).

**En résumé, la séparation maternelle aboutit à des altérations à long terme de la barrière intestinale, des modifications de la flore intestinale et une hypersensibilité, qui peuvent être mis en parallèle des symptômes observés dans le syndrome de l'intestin irritable, chez l'homme.**

## **2.2 Conséquences neuroendocrines et neurophysiologiques à long terme de la séparation maternelle**

### *2.2.1. Conséquences neuroendocrines à long terme de la séparation maternelle*

Des manipulations postnatales exercent des effets à long terme sur le fonctionnement de l'axe corticotrope. Chez l'animal adulte, la séparation maternelle entraîne une hyperactivité de l'axe corticotrope en réponse à un stress (Biagini et al., 1998; Huot et al., 2002; Ladd et al., 2000; Ladd et al., 1996; Lehmann et al., 2002; Patchev et al., 1997; Plotsky et Meaney, 1993; Rosenfeld et al., 1992).

Cependant, quelques études ne retrouvent ces changements de réactivité de l'axe corticotrope (Eiland et McEwen, 2012; Hulshof et al., 2011). Dans une étude, la

séparation maternelle a même été associée à une atténuation de la libération de l'ACTH et de CORT (corticostérone) après un stress (Daniels et al., 2004).

Ces divergences peuvent s'expliquer par les différences de protocoles de séparation maternelle ou par le type de « stresser » employés ou par des manipulations accrues des animaux, amenant ainsi à une atténuation des effets de la séparation maternelle sur l'axe corticotrope.

Cette hyperactivité de l'axe corticotrope est associée, au niveau central, à une augmentation du niveau d'expression de CRH (corticotropin-releasing hormone) dans le noyau paraventriculaire (NPV), l'amygdale ou de la quantité de CRH dans le locus coeruleus (Francis et Meaney, 1999; Ladd et al., 1996; Plotsky et Meaney, 1993) ainsi qu'à une augmentation de ses récepteurs dans le locus coeruleus et le noyau du raphé (Ladd et al., 2000; Ladd et al., 1996). La séparation maternelle altère aussi les systèmes qui régulent la synthèse de CRH. L'expression de la CRH dans le noyau paraventriculaire (NPV) est soumise au rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes. La séparation maternelle diminue l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe et le cortex préfrontal (Diorio et al., 1993), régions qui sont impliquées dans l'effet inhibiteur des glucocorticoïdes sur la synthèse de CRH des neurones du NPV (Dallman et al., 1994; de Kloet et al., 1991; Francis et Meaney, 1999; Liu et al., 1997; Liu et Koski, 1997; Rivarola et Suarez, 2009; Wilber et Wellman, 2009). Par ailleurs, la séparation maternelle diminue le nombre de récepteurs GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) dans les neurones noradrénergiques du locus coeruleus, ainsi que le nombre de récepteurs centraux aux benzodiazépines dans les noyaux latéraux et centraux de l'amygdale, le locus coeruleus et le cortex préfrontal (Caldji et al., 2000). Le système GABA/benzodiazépines joue un rôle dans l'inhibition de la synthèse de CRH dans le noyau central amygdalien permettant ainsi de réduire la réponse noradrénergique au stress. De manière intéressante, des courtes séparations produisent des effets comportementaux et neuroendocrines opposés à ceux de séparations maternelles prolongées. Ceci suggère des liens étroits entre ces altérations neuroendocrines et l'hyperactivité de l'axe corticotrope suite à un stress chez des animaux exposés à la séparation maternelle. Cependant, d'autres études proposent que ces effets seraient sous tendus par des modifications des systèmes de neurotransmission.

### *2.2.2. Conséquences neurobiologiques à long terme de la séparation maternelle*

Cette partie décrit, de manière non exhaustive, les altérations neurobiologiques associées à la séparation maternelle.

La séparation maternelle affecte les systèmes de neurotransmission. Bien que de nombreuses différences dans les neurotransmetteurs aient pu être mises en évidence, les résultats les plus constants concernent le système sérotoninergique (Bravo et al., 2014; Cotella et al., 2013; Daniels et al., 2004; O'Mahony et al., 2008). Au niveau central, la sérotonine est impliquée dans la réponse émotionnelle, le développement neuronal (Daubert et Condron, 2010) ainsi que dans la modulation de la douleur (Kim and Camilleri, 2000; Sommer, 2004). Des rats exposés à la séparation maternelle présentent des altérations du système sérotoninergique, notamment une augmentation de la sérotonine dans le cortex préfrontal, et une augmentation de l'expression des récepteurs sérotoninergiques 5HT-1A, 1B et 2A dans le cortex et l'hippocampe (Matthews et al., 2001). Les animaux exposés à la séparation maternelle présentent également une diminution de l'expression de SERT (transporteur de la sérotonine) dans le noyau du raphé (Bravo et al., 2014). Une augmentation des neurones sérotoninergiques, dans le noyau dorsal du raphé et la moelle épinière, a été associée aux modulations de la douleur chez des rats exposés à la séparation maternelle (O'Mahony et al., 2008). Il est intéressant de noter qu'un traitement avec un inhibiteur de la recapture de la sérotonine normalise les altérations de l'axe corticotrope et les perturbations émotionnelles ainsi que la consommation d'alcool chez des rats exposés à la séparation maternelle, suggérant ainsi un rôle important de la sérotonine dans les conséquences de la séparation maternelle (Huot et al., 2001).

Par ailleurs, la séparation maternelle altère le système mésolimbique dopaminergique, important pour la régulation des propriétés récompensantes des drogues d'abus (Arborelius et Eklund, 2007; Brake et al., 2004; Ploj et al., 2003a). La transmission dopaminergique est en partie régulée par la recapture de la dopamine par son transporteur (DAT). La séparation maternelle diminue l'expression de DAT dans différentes régions ou altère l'expression des récepteurs à la dopamine (Matthews et al., 2001; Meaney et al., 2002; Ploj et Nylander, 2003). Ces modifications pourraient être en

partie responsables de l'augmentation de la réponse dopaminergique au stress (Matthews et al., 2001) ou de la sensibilité accrue aux drogues, chez des animaux exposés à la séparation maternelle. Par ailleurs, des altérations du système dopaminergique ont aussi été mises en évidence dans le cortex préfrontal de rats exposés à la séparation, qui pourraient sous-tendre les déficits observés dans la tâche de reconnaissance temporelle d'objets (Lejeune et al., 2013).

La séparation maternelle affecte différents aspects de la plasticité fonctionnelle ou structurale. En effet, certaines études ont aussi rapporté des effets des manipulations de l'environnement précoce sur les niveaux de neurotrophines dans diverses structures.

Les niveaux de neurotrophines NGF (nerve growth factor) et NT3 (neurotrophine 3) sont diminués dans l'hippocampe ventral et augmentés dans l'hippocampe dorsal chez des rats ayant expérimenté des séparations maternelles prolongées en période postnatale (Marais et al., 2008; Reus et al., 2011). Une diminution des niveaux de NGF et NT3 a aussi été rapportée dans l'amygdale (Aisa et al., 2009). De plus, la séparation maternelle diminue l'expression de BDNF (brain derived neurotrophic factor) dans l'hippocampe (Aisa et al., 2009; de Lima et al., 2011; Lippmann et al., 2007; Solas et al., 2010) ou atténue l'augmentation de BDNF après un stress (Roceri et al., 2004; Roceri et al., 2002). Cependant, une autre étude a montré une augmentation des niveaux protéiques de BDNF dans l'hippocampe (Greisen et al., 2005). Les auteurs avaient expliqué cette augmentation par la manipulation répétée des rats avant les tests comportementaux, qui avait pu modifier les effets de la séparation maternelle sur les niveaux de BDNF. Une diminution de l'expression de BDNF, ou une atténuation de l'augmentation suite à un stress ont été rapportées dans le cortex préfrontal des animaux exposés à la séparation maternelle (Burton et al., 2007; Roceri et al., 2004). Cependant, d'autres études n'ont mis en évidence aucune modification dans cette région. Ces divergences de résultats peuvent s'expliquer par les variations de la période d'évaluation du BDNF. En effet, il semble que la séparation maternelle modifie l'expression de BDNF de manière variable selon l'âge des animaux (Kuma et al., 2004).

Par ailleurs, la séparation maternelle entraîne une diminution de neurogenèse à l'âge adulte (Hays et al., 2012; Hulshof et al., 2012; Mirescu et al., 2004; Suri et al., 2013). Elle entraîne aussi des modifications de la morphologie neuronale ou du nombre d'épines

dendritiques, dans différentes structures comme le cortex préfrontal, le noyau accumbens ou l'hippocampe (Chocyk et al., 2013; Monroy et al., 2010; Muhammad et al., 2012).

La séparation maternelle perturbe les systèmes de transmission glutaminergique (Kosten et al., 2007; Pickering et al., 2006) et GABAergique (Feng et al., 2014; Leon Rodriguez et Duenas, 2013; Sterley et al., 2013) et perturbe la potentialisation à long terme dans l'hippocampe (Cao et al., 2014; Sousa et al., 2014) et dans le cortex préfrontal (Baudin et al., 2012).

### **2.3. Conséquences endocrines et neurobiologiques de la séparation maternelle pendant le développement**

Des fluctuations de l'activité de l'axe corticotrope pendant l'enfance peuvent être délétères pour le cerveau immature en développement (Gutman et Nemeroff, 2002). Chez le rat, il existe une période pendant laquelle le raton en développement est moins sensible au stress, la période d'hypo-réponse au stress. Cette période, qui s'étend de J4 à J14, (Rosenfeld et al., 1993; Sapolsky et Meaney, 1986; Suchecki et al., 1993b) se caractérise par des taux plasmatiques de CORT très bas ainsi qu'une amplitude des réponses ACTH et CORT limitée suite à l'exposition à un stress (chirurgie, exposition à l'éther, des challenges thermiques, etc.). Cette période d'hypo-réactivité au stress pourrait être apparentée à un processus de protection du cerveau en développement contre les effets délétères d'une exposition à des taux élevés de CORT (Meyer, 1985). Cependant, la réduction de la réactivité au stress de l'axe corticotrope n'est pas absolue, puisqu'un « stresseur » puissant comme la séparation maternelle peut l'activer (Anisman et al., 1998; Francis et Meaney, 1999; Gutman et Nemeroff, 2002; Vazquez, 1998).

Chez le rongeur, le cerveau se développe surtout pendant la période postnatale, notamment via des processus de synaptogenèse, de développement dendritique, de neurogénèse et d'apoptose (Gutman et Nemeroff, 2002). Des séparations maternelles répétées produisent des altérations structurales, comme des retards du développement synaptique (Andersen et Teicher, 2004) et une augmentation de la mort neuronale et gliale (Kuma et al., 2004; Mirescu et al., 2004; Zhang et al., 2002). La séparation maternelle modifie l'expression de certaines neurotrophines comme le BDNF ou le NGF

pendant le développement (Cirulli et al., 2000; Kuma et al., 2004; Roceri et al., 2004). De plus, il a été montré que la séparation maternelle perturbe le système sérotoninergique pendant le développement. Par exemple, il a été observé une diminution de l'expression des récepteurs 5HTr1A dans l'hippocampe et le cortex préfrontal médian à l'âge de 7 jours (Ohta et al., 2014).

Une autre étude a pu mettre en évidence l'importance de certains marqueurs dans l'établissement des altérations comportementales après séparation maternelle. En effet, des rats exposés à la séparation maternelle présentent une augmentation transitoire de l'expression de Rest4 (RE-1 silencing transcription factor-4) dans le cortex préfrontal médian. Rest4 est un variant du facteur de transcription Rest, qui régule, via des processus épigénétiques, des gènes impliqués dans la différenciation neuronale (Thiel et al., 2014). Cette augmentation de Rest4 est associée à une augmentation de certains gènes cibles de ce facteur de transcription, tels que 5HTr1A, Crh, Bdnf ainsi que les sous unités des récepteurs glutamatergiques AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) et NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique), GluR2 et Nr1. En utilisant une infection virale, les auteurs ont surexprimé Rest4 dans le cortex préfrontal de rats témoins. De manière intéressante, la surexpression de ce facteur, spécifiquement pendant le développement, induit des altérations du comportement émotionnel à l'âge adulte et une hyperactivité de l'axe corticotrope, semblables à celles observées chez des rats exposés à la séparation maternelle. Il avait alors été proposé que des perturbations d'expression de Rest4, pendant le développement, entraînent des modifications de la mise en place des circuits neuronaux dans le cortex préfrontal, pouvant expliquer les effets à long terme de la séparation maternelle (Uchida et al., 2010). Par ailleurs de nombreux travaux montrent que le stress précoce est associé à des altérations épigénétiques, pour revue (Lutz et Turecki, 2014)

**En conclusion, nous venons de voir que la séparation maternelle induit des altérations qui sont caractéristiques des effets à long terme observés chez l'homme dans le cas d'adversité précoce. Ceci suggère que la séparation maternelle est un bon modèle permettant d'étudier les mécanismes sous tendant la vulnérabilité à différentes maladies de l'âge adulte, chez les individus exposés à l'adversité précoce (Figure 3).**

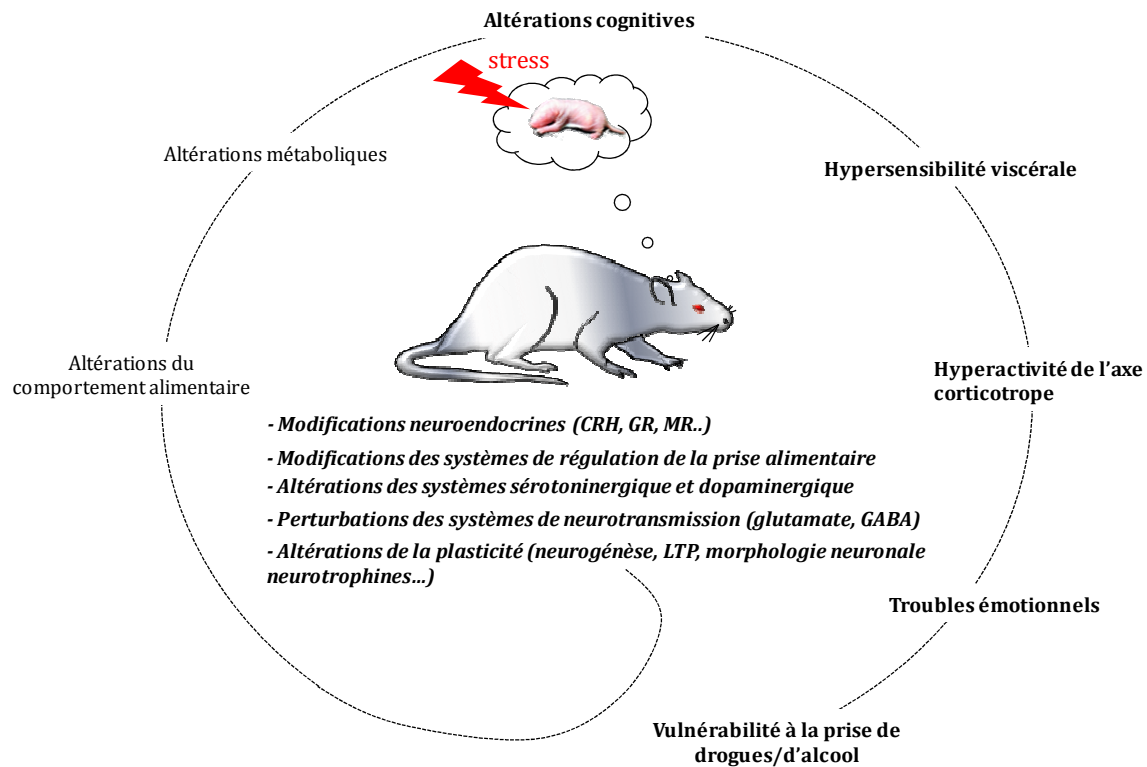


Figure 3: Schéma des altérations à long terme de la séparation maternelle ainsi que les perturbations neuroendocrines et neurobiologiques pouvant sous-tendre ces altérations.

Nous assistons de nos jours à une modification des habitudes alimentaires, avec une augmentation de la consommation d'aliments palatables, à forte densité calorique, souvent riches en lipides. L'adversité est souvent combinée à un environnement nutritionnel déséquilibré dans des environnements socio-économiques défavorisés. En effet, la pauvreté dans l'enfance constitue un stress chronique et un faible niveau socio-économique est plus souvent associé à des déséquilibres alimentaires (Drewnowski, 2004). Cependant, l'impact de ces changements alimentaires sur les effets de l'adversité précoce n'est pas connu. Or, il existe des liens étroits entre le stress et la nutrition.



### **III- Mise en évidence des interactions entre stress et nutrition**

Dans cette partie, nous nous intéressons aux relations bidirectionnelles qui existent entre le stress et nutrition, en particulier le lien entre stress et nourritures palatables.

#### **3.1. Etudes des liens entre stress et comportement alimentaire chez l'homme**

##### *3.1.1. Modifications du comportement alimentaire par le stress*

Une revue de Macht (Macht, 2008) rassemblant les résultats de 36 études expérimentales portant sur l'humeur et le comportement alimentaire, conduites entre 1968 et 2002 rapporte que 43% des résultats indiquent une augmentation de l'appétit ou de la consommation alimentaire en réponse à un affect négatif, 39% indiquent une diminution et 26% aucune modification.

Une étude menée dans une cohorte de 179 étudiants en période d'examen n'a montré aucun lien entre le comportement alimentaire et le stress auto-perçu dans l'ensemble de la population. En revanche, il a été mis en évidence que les étudiants présentant une anxiété importante et un faible soutien social, rapportent aussi une augmentation de la consommation d'aliments riches en lipides pendant leur période d'examen par rapport à leur consommation habituelle (Pollard et al., 1995). Une étude similaire a montré que 42% des participants avouent manger plus et 39% rapportent une diminution de leur consommation alimentaire lors des périodes stressantes (Oliver et Wardle, 1999).

Wallis et Hetherington ont montré qu'environ la moitié des participants avouent qu'ils mangeaient plus de biscuits ou chocolat quand ils se sentaient stressés (Wallis and Hetherington, 2004). Ces résultats concordent avec une étude précédente mettant en évidence une augmentation de la consommation de sucreries sous stress. Cependant, celle-ci ne concernait que les participantes qui présentaient une augmentation importante de cortisol au stress (Epel et al., 2000). Des résultats similaires ont été retrouvés dans une étude mettant en évidence que l'augmentation de la fréquence de grignotage liée au stress n'était observable que chez des sujets « high cortisol reactors » (Newman et al., 2007). Une faible proportion de sujets indique manger plus de fruit et

légumes sous stress (Kandiah et al., 2006; Laitinen et al., 2002; Oliver et Wardle, 1999). La conclusion des auteurs était que le stress induisait des comportements alimentaires malsains.

De manière intéressante, les résultats de ces études ont aussi montré que les relations entre le stress et le grignotage étaient plus importantes chez les femmes (Cleobury et Tapper, 2014), les « mangeurs émotionnels ». Le terme de « mangeur émotionnel » réfère à un individu qui augmente sa consommation alimentaire en réponse à un affect négatif (Greeno et Wing, 1994; van Strien et Ouwens, 2003).

**En résumé, chez l'homme, les liens entre stress et comportement alimentaire sont complexes et soumis à de fortes variations inter-individuelles en fonction du genre, ou des traits de personnalité. Cependant, il semble clair que le stress influence le comportement alimentaire, et entraîne notamment une consommation d'aliments palatables.**

### *3.1.2. Modulations des effets du stress par la nutrition*

De nombreuses études ont pu mettre en évidence que le stress ou un affect négatif étaient associés à une augmentation de la fréquence de grignotage. Il a été proposé que le grignotage permettrait d'éloigner son attention de l'expérience stressante et représenterait un mécanisme d'adaptation et de régulation émotionnelle (Macht et al., 2005; Macht et Simons, 2000).

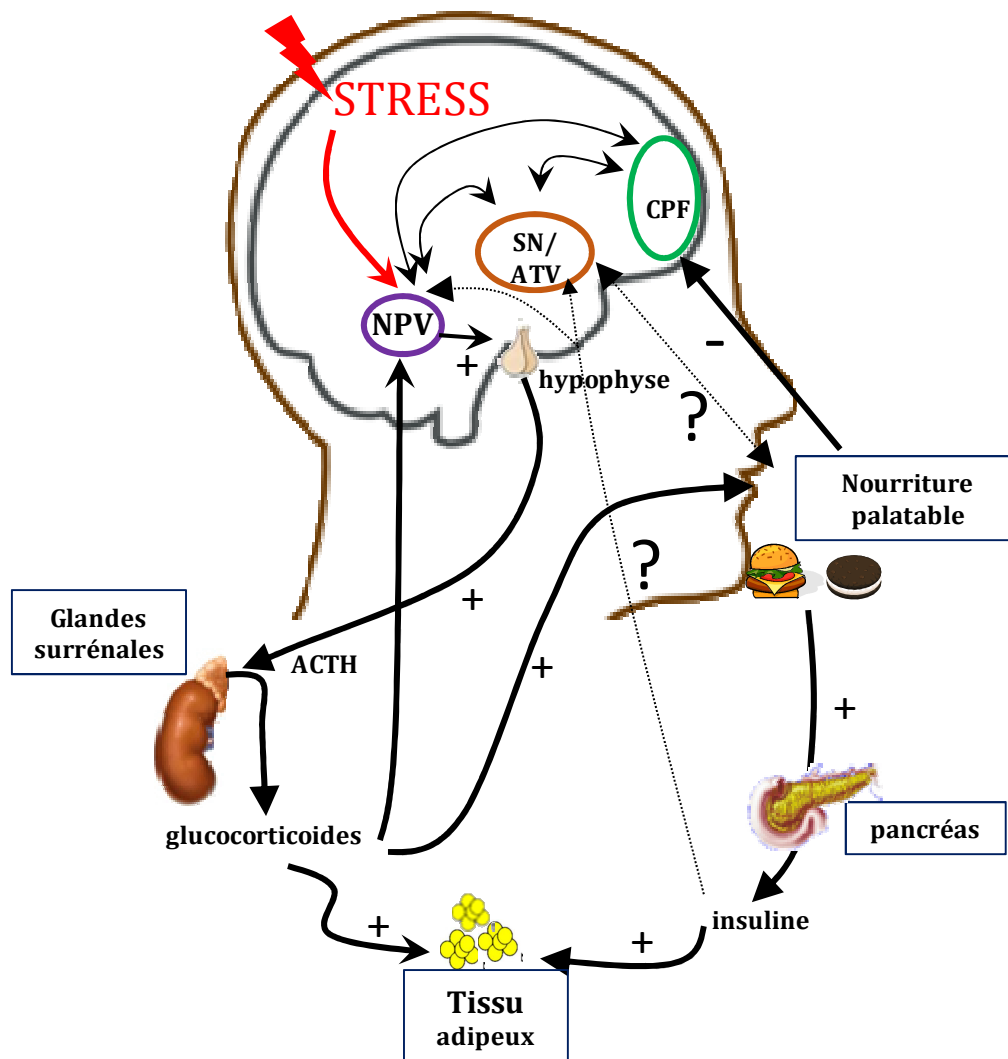
Par ailleurs, la consommation d'un repas pauvre en glucides et riche en protéines améliore l'humeur de sujets exposés à un stress incontrôlable de laboratoire, mais seulement chez les sujets considérés comme « sensibles » au stress. Cependant, aucun effet n'est non plus observé quand le repas est constitué d'aliments riches en glucides et pauvres en protéines. Par ailleurs, il n'y a pas d'effet de l'ingestion du repas chez les sujets « résistants » au stress (Markus et al., 2000).

Des résultats similaires ont été observés chez des femmes soumises à un stress psychologique en laboratoire. Après une tâche de calcul mental suivie d'une

présentation orale de 5min, il était demandé aux participantes d'évaluer leurs émotions négatives engendrées par ce stress. En fonction des résultats à ce test de sensibilité au stress, elles étaient ensuite subdivisées en 2 catégories, « low » vs « high » stress. Le groupe des « high-stress », donc les plus sensibles au stress, un indice de masse corporelle et un tour de taille plus importants et est aussi caractérisé par une fréquente importante de grignotage dans des situations de stress. De manière intéressante, ces participantes « high stress » présentent une atténuation de la libération de cortisol en réponse au stress aigu de laboratoire (Tomiyaama et al., 2011).

Dans une étude récente, les auteurs se sont intéressés à l'impact du stress chronique et de la réactivité à un stress aigu sur la prise alimentaire chez des femmes d'âge moyen. Ces femmes étaient exposées à une tâche de « trier social stress », pour laquelle les expérimentateurs leurs indiquaient qu'elles avaient 5 min pour préparer une présentation orale. Les participantes témoins étaient, quant à elles, soumises à une tâche n'induisant aucun stress. Après la tâche, les participantes avaient un accès à un buffet composé de divers aliments comme des cookies, du gâteau au chocolat, etc. En parallèle, les taux salivaires étaient collectés lors de la pré-visite et le jour du stress. Il a alors été montré que des femmes qui rapportent un niveau important de stress chronique et présentant une faible réactivité cortisolémique à un stress aigu de laboratoire consomment significativement plus de chocolat et de gâteaux au cours de la pré-visite et le jour du stress (Tryon et al., 2013a; Tryon et al., 2013b).

Les mécanismes sous tendant cette augmentation de la consommation d'aliments palatables sous stress sont encore peu connus. Cependant, certains suggèrent l'action concomitante des glucocorticoïdes, de l'insuline et du tissu adipeux dans la régulation de la consommation d'aliments palatables et dans la modulation de l'axe corticotrope **(Figure 4)**.



### 3.2. Etudes des liens entre stress et comportement alimentaire chez l'animal

#### 3.2.1. Effets du stress sur le comportement alimentaire chez l'animal

La relation entre stress et prise alimentaire, chez l'animal, semble moins sensible aux variations interindividuelles, car dans la majeure partie des cas, le stress diminue la prise alimentaire. Cependant, l'effet du stress sur la consommation alimentaire semble être modifié en fonction du type de stress appliqué.

En effet, des stress considérés comme légers, comme le pincement de la queue ou encore les manipulations entraînent une augmentation transitoire de la prise de nourriture, chez le rongeur (Antelman and Szechtman, 1975; Badiani et al., 1996; Nemeroff et al., 1978). En revanche, l'exposition à un stress d'intensité modérée à forte diminue la consommation alimentaire chez le rat comme chez la souris. A titre d'exemple, une diminution de la prise alimentaire a été rapportée après un stress de nage forcée (Diane

et al., 2008), de contention (Harris et al., 2002; Rybkin et al., 1997) ou d'immobilisation (Ricart-Jane et al., 2002; Valles et al., 2000), après un stress de chocs électriques (Marquez et al., 2002) ou après un stress de défaite sociale (Meerlo et al., 1996). Comme chez l'homme, le comportement alimentaire lié au stress diffère en fonction du type de nourriture proposé.

Des études menées chez les primates non humains ont montré que le stress ou le statut émotionnel pouvaient influencer la préférence alimentaire, et orienter la prise d'aliments dits palatables. Dans une étude examinant les comportements alimentaires chez des femelles macaques vivant en société, ces femelles étaient exposées à deux conditions différentes, une condition où seul un régime standard était disponible et une autre, où un régime enrichi en gras et sucre en libre choix, était accessible en plus du régime standard. Alors que les femelles dominantes ne montrent aucune différence de la prise alimentaire entre ces deux conditions, il a été observé que les femelles dominées consomment plus de nourriture quand elles ont accès à un régime gras et sucré (Michopoulos et al., 2012).

La consommation d'aliments palatables riches en gras et en sucre de manière aigüe ou chronique a aussi été montrée pour diminuer les effets du stress, chez le rongeur. Ainsi, des rats exposés à un stress chronique de contention consomment la même quantité d'énergie que des rats non stressés, mais consomment plus d'aliments palatables (lard et sucre) (la Fleur et al., 2005). Des résultats similaires ont été obtenus dans une autre étude. Des rats stressés, qui ont un accès à une nourriture palatable comme le sucre ou le lard, augmentent leur consommation alimentaire (Pecoraro et al., 2004).

Ely et al. ont étudié les effets du stress aigu vs. chronique sur la consommation de pastilles sucrées appétantes, en ajoutant comme variable le statut nutritionnel des animaux (restriction alimentaire vs. *ad libitum*). Après le stress, les rats étaient placés dans une arène ouverte au centre de laquelle se trouvaient des pastilles sucrées. Le stress aigu n'a aucune influence sur leur prise alimentaire, que les rats aient été ou non soumis à une restriction alimentaire. En revanche, il a été montré que des rats stressés chroniquement présentent une augmentation de leur consommation de pastilles palatables, d'autant plus importante s'ils sont en restriction alimentaire (Ely et al., 1997). Ce résultat peut être mis en parallèle avec les études chez l'homme qui ont

montré que les individus qui suivent un régime, sont plus sensibles aux effets du stress sur la prise alimentaire (Lowe and Kral, 2006).

**Etant donné les liens étroits entre stress et nourriture palatable hyperlipidique, nous allons maintenant nous intéresser à l'impact d'un régime hyperlipidique sur les effets du stress.**

### *3.2.2. Effets des régimes hyperlipidiques palatables sur le stress chez l'animal*

#### $\alpha$ . Régime hyperlipidique : anxiogène et potentialisateur de la réponse au stress

Une récente étude montre que des souris qui consomment un régime hyperlipidique, pendant 12 semaines, présentent une augmentation des comportements anxieux et dépressifs dans les tâches de l'arène ouverte et du test de la nage forcée. De plus, ces souris ont des taux de corticostérone plus élevés après l'exposition au test de nage forcée (Sharma et Fulton, 2013). Buchenauer a décrit une réduction des redressements associée à une augmentation de « grooming », indiquant une augmentation des comportements de type anxieux, chez des rats nourris avec un régime contenant 35% de lipides pendant 8 semaines (Buchenauer et al., 2009).

Par ailleurs, d'autres études ont montré que le régime hyperlipidique entraîne une exacerbation de l'activité de l'axe corticotrope.

En effet, des rats nourris avec un régime hyperlipidique présentent une augmentation de la libération de corticostérone en réponse à un stress de contention de 20min (Kamara et al., 1998) ou un stress de nage forcée (Pascoe et al., 1991). Tannenbaum et al. ont montré que des rats sous régime hyperlipidique contenant 40% de gras pendant 7 ou 21 jours présentent une augmentation des taux de base de corticostérone et d'ACTH ainsi qu'une augmentation d'activité de l'axe corticotrope en réponse à un stress de contention par rapport à des rats sous régime standard (Tannenbaum et al., 1997).

Il a été mis en évidence qu'une exposition pendant 4 jours à un régime hyperlipidique est suffisante pour induire une augmentation des taux de CORT après un stress modéré. Le même résultat est obtenu quand l'exposition est maintenue pendant 9 jours mais

n'est plus observable dans le cas d'une exposition à 23 jours de régime (Legendre and Harris, 2006). Une étude plus récente a montré des résultats similaires, à savoir une augmentation des taux de CORT après un stress de défaite sociale, chez des rats nourris avec un régime hyperlipidique (Mitra et al., 2011).

En conclusion, le régime hyperlipidique semble agir comme un « stressueur » et entraîner une exagération de l'activité de l'axe corticotrope. Il a été proposé que le surpoids pourrait être impliqué dans ces dérégulations de l'axe corticotrope. Cependant, dans les études précédentes chez l'animal (Kamara et al., 1998; Legendre and Harris, 2006; Pascoe et al., 1991), les perturbations de l'activité de l'axe corticotrope observées sous régime hyperlipidique, ne semblent pas être liées à un surpoids, puisque les rats ne présentent aucune augmentation du poids, du fait des faibles durée d'exposition ou du type de régimes utilisés. Il semble donc que le régime hyperlipidique *per se* puisse agir sur l'axe corticotrope.

Tannenbaum et al. ont observé une élévation des acides gras circulants en condition basale et après stress chez les rats sous régime hyperlipidique. Or, il a été montré qu'une augmentation des acides gras, via une infusion intraveineuse de lipides, est suffisante pour augmenter les taux plasmatiques de corticostérone et d'ACTH (Widmaier et al., 1992). De manière intéressante, l'application d'acides gras entraîne une diminution de la fréquence de décharges des neurones de l'hypothalamus ventromédian (Oomura et al., 1975) qui exercent un contrôle inhibiteur sur l'axe corticotrope (Dallman et al., 1994). Il a, donc, été proposé que les acides gras pourraient altérer la régulation hypothalamique de l'axe corticotrope, conduisant ainsi à une augmentation des niveaux de glucocorticoïdes.

Par ailleurs, il a été suggéré que le régime hyperlipidique agisse comme un stress chronique sur le cerveau. Les glucocorticoïdes, dans le cas d'une concentration élevée, exercent un rôle antagoniste aux effets de l'insuline, induisant une augmentation des concentrations plasmatiques de glucose. Ainsi, une élévation des taux de glucocorticoïdes induit les mêmes effets que des régimes hyperlipidiques, soulevant la possibilité que certains des effets du régime hyperlipidique puissent être initiés par une augmentation des taux de glucocorticoïdes.

### β. Régime hyperlipidique : anxiolytique et atténuateur de la réponse au stress

Il a été montré que la consommation d'un régime hyperlipidique palatable agit sur les comportements émotionnels.

La consommation d'un régime hyperlipidique (dont 90% des kilocalories proviennent des lipides) pendant 7 jours est suffisante pour diminuer les comportements de type anxieux dans une tâche de labyrinthe en croix surélevée (Prasad et Prasad, 1996). Alsio et al. ont mis en évidence une corrélation négative entre le comportement de type anxieux et la préférence pour un régime hyperlipidique. En effet, les rats qui consomment plus de régime hyperlipidique, dans une situation de choix de régimes (riche en lipides vs. riche en protéines vs. riche en glucides), sont aussi ceux qui passent plus de temps dans les bras aversifs d'un labyrinthe en croix surélevée (Alsio et al., 2009b). Cette même équipe a aussi montré qu'une augmentation de la motivation pour des pastilles sucrées dans la tâche de conditionnement opérant est associée à un faible comportement de type anxieux dans le labyrinthe en croix surélevée (Alsio et al., 2009a). De plus, il a été mis en évidence que l'exposition à un régime riche en lipides et en sucre a des effets anxiolytiques dans le test de l'arène ouverte (Marcolin Mde et al., 2012).

Par ailleurs, la consommation d'un régime hyperlipidique peut aussi atténuer la réponse endocrine à un stress.

Ainsi, une étude chez la souris, a montré qu'un régime hyperlipidique enrichi en graisses animales diminue les concentrations plasmatiques de corticostérone, dès la première semaine d'exposition (Auvinen et al., 2012). Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat. Ainsi, lorsque des rats sont nourris avec un régime palatable composé de saindoux au choix avec un régime standard, ils présentent une diminution des niveaux d'ACTH et de corticostérone après un stress de contention par rapport à des rats exposés au régime standard (la Fleur et al., 2005). De manière intéressante, cette étude a montré que les effets du régime palatable sur l'atténuation de l'activité de l'axe corticotrope ne sont observables que lorsque ce régime est proposé en libre choix. En



effet, des rats exposés à un régime tout autant palatable mais obtenu grâce à un mélange de saindoux et de régime standard ne présentent aucune atténuation des niveaux de corticostérone et d'ACTH en réponse au stress.

Par ailleurs, des rats ayant un accès limité à un régime palatable riche en sucre et en lipides (2h/jour) présentent une atténuation de l'élévation de corticostérone après un stress de contention par rapport à des rats ayant un accès libre ou n'ayant pas accès à ce régime (Kinzig et al., 2008).

Une exposition réduite de 6 jours à un régime riche en lipides et en sucre est suffisante pour diminuer les niveaux de corticostérone chez des rats exposés à un stress de chocs électriques, sans affecter les taux de base (Ortolani et al., 2011). Les effets des régimes palatables sur la réponse endocrine au stress ont été aussi retrouvés dans le cas de stress chronique (Bell et al., 2002; Pecoraro et al., 2004).

Des résultats similaires ont été obtenus avec un régime riche en sucre ou en saccharose (Ulrich-Lai et al., 2007). Il est intéressant de noter que le sucrose et la saccharine produisent les mêmes effets d'atténuation sur la réponse au stress, indiquant que l'apport élevé de calories qui pourrait résulter de l'ingestion de ce type de nourriture, n'est pas responsable des effets observés.

La consommation d'un régime hyperlipidique module les altérations émotionnelles induites par un stress.

Ainsi, un régime hyperlipidique restaure le phénotype anxieux et dépressif chez des souris exposées à un stress de défaite sociale (Finger et al., 2011).

Une autre étude montre que du chocolat donné en plus de la nourriture standard pendant 40 jours avant l'exposition à un stress chronique de contention protège contre les effets délétères de ce stress sur les comportements de type anxieux (Krolow et al., 2010). L'accès à un régime palatable pendant la période juvénile, protège contre les altérations émotionnelles induites par un stress chronique imprévisible. Cependant, cet effet protecteur du régime palatable est retardé, puisqu'il n'est visible qu'à l'âge adulte (MacKay et al., 2014).

Des effets protecteurs du régime hyperlipidique ont été rapportés dans le modèle de séparation maternelle. En effet, les altérations émotionnelles présentes chez des mères

exposées au protocole de séparation maternelle sont contrecarrées par la consommation d'un régime hyperlipidique (Maniam et Morris, 2010a). Par ailleurs, un régime hyperlipidique après le sevrage restaure les altérations des comportements de type anxieux et dépressifs chez des rats ayant été exposés à la séparation maternelle pendant les 2 premières semaines de vie (Maniam et Morris, 2010b, c). En revanche, l'impact d'un régime maternel hyperlipidique, pendant la période périnatale, sur les effets de la séparation maternelle n'a jamais été étudié. De plus, les conséquences de cet environnement précoce nutritionnel hyperlipidique, indépendamment de l'obésité maternelle, sur la sphère cognitivo-émotionnelle des descendants adultes, sont très peu connues.

**Nous aborderons dans la prochaine partie, les données de la littérature examinant les conséquences d'un régime périnatal hyperlipidique sur le phénotype de la descendance.**

## **IV- Conséquences d'un environnement nutritionnel précoce hyperlipidique**

### **3.1. Bouleversements alimentaires et conséquences sur la programmation du phénotype**

De nombreux travaux ont mis en évidence que l'environnement nutritionnel *in utero* et pendant l'enfance entraîne des conséquences à long terme sur le développement de troubles métaboliques à l'âge adulte, pour revue (Bruce and Hanson, 2010; McMillen and Robinson, 2005). Les premières observations d'une possible programmation du phénotype métabolique ont été faites à la fin des années 1980 par l'épidémiologiste britannique, David Barker, qui a rapporté la relation entre un faible poids à la naissance et un risque accru de développer du diabète de type 2, de l'hypertension ou des maladies cardio-vasculaires (Barker et al., 1993a; Barker et al., 1993b; Hales et al., 1991; Phipps et al., 1993). Des études épidémiologiques ont ensuite confirmé que la sous-nutrition pendant différentes phases de la grossesse augmente la prévalence de l'obésité et de l'insulino-résistance (Al-Almaie, 2005; Sanchez-Castillo et al., 2005; van der Sande et al., 2001).

Nous assistons à l'heure actuelle à des modifications des habitudes alimentaires, et notamment à une augmentation de la consommation d'aliments à forte densité énergétique, souvent riches en lipides (Cordain et al., 2005). Alors qu'au début des années 60, les lipides venant de sources animales étaient les plus consommés, leur consommation a depuis baissé, malgré l'augmentation de la consommation globale de lipides. Ceci peut s'expliquer par une consommation croissante d'huiles végétales, qui a été, par exemple, multipliée par 3 dans les pays en voie de développement et par 2 dans les pays industrialisés (Kearney, 2010). Parmi les huiles végétales, on note l'augmentation des huiles végétales riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) n-6 aux dépens des huiles riches en AGPI n-3, entraînant ainsi un déséquilibre du ratio AGPI n-6/n-3 caractéristique des sociétés modernes actuelles (Blasbalg et al., 2011).

L'implication des nutriments dans la prolifération cellulaire, la synthèse d'ADN (acide désoxyribonucléique) et dans les systèmes enzymatiques souligne l'importance de la nutrition périnatale pour le développement de l'individu (Bhatnagar and Taneja, 2001;

de Souza et al., 2011; Zeisel, 2006; Zimmermann, 2007). Les bouleversements actuels des habitudes alimentaires vont directement ou indirectement touchés l'individu en développement. Chez l'homme, il est difficile d'examiner les conséquences à long terme de l'environnement nutritionnel de type « occidental » sur le phénotype de l'individu. En effet, les études rétrospectives ne permettent pas d'avoir accès à des contrôles adéquats sur la nature ou la quantité des nutriments ingérés. De plus, les habitudes alimentaires actuelles sont souvent associées à un surpoids ou une obésité maternelle. Des études rapportent que l'obésité maternelle est un facteur de vulnérabilité dans l'émergence de troubles métaboliques et à l'obésité chez la descendance à l'âge adulte (Plagemann et al., 1997; Whitaker, 2004). Cependant, l'impact de la nutrition précoce hyperlipidique, indépendamment de l'obésité maternelle, sur le phénotype métabolique de la descendance adulte a rarement été exploré. Par ailleurs, les effets à long terme de cet environnement précoce hyperlipidique, sur la sphère cognitivo-émotionnelle, ne sont pas connus. Les modèles animaux représentent donc des outils intéressants pour aborder ces questions.

## **3.2. Impact d'un régime précoce hyperlipidique chez l'animal**

### *3.2.1. Conséquences d'un régime maternel hyperlipidique sur le phénotype métabolique*

De nombreuses études chez le rat et chez la souris ont montré que la consommation d'un régime hyperlipidique par la mère peut entraîner de l'obésité, une résistance à la leptine ou à l'insuline (Chen et al., 2009; Taylor and Poston, 2007), de l'hypertension (Elahi et al., 2009; Liang et al., 2009) et des stéatoses hépatiques (Bouanane et al., 2009; Gregorio et al., 2010) chez la descendance à l'âge adulte.

Cependant, même dans les études animales, la dissociation entre le régime maternel et l'obésité maternelle n'est que très peu abordée.

En effet, dans la plupart des études, l'exposition au régime hyperlipidique aboutit à une augmentation du poids chez la mère. Or, il semble que l'obésité maternelle et les désordres métaboliques associés sont des facteurs prépondérants dans la programmation du phénotype métabolique de la descendance.

En effet, Shankar et al., ont procédé à des adoptions croisées, dans le but d'isoler les effets de l'obésité maternelle sur le développement. Ces auteurs ont rapporté que les descendants ayant été exposés à l'obésité maternelle pendant la gestation sont plus susceptibles aux effets obésogènes d'un régime hyperlipidique après le sevrage par rapport à des descendants de mères témoins (Shankar et al., 2008).

Par ailleurs, il a été montré que les descendants de mères obèses (*i.e* sous régime hyperlipidique en accès libre) présentent des altérations métaboliques qui ne sont pas retrouvées chez des descendants de mères non obèses (*i.e* ayant un accès restreint au régime hyperlipidique) (White et al., 2009b). Les hypothèses proposées pour expliquer les conséquences de la nutrition précoce hyperlipidique et le développement de l'obésité ou de troubles métaboliques à l'âge adulte, incluent des perturbations des circuits hypothalamiques (Davidowa et al., 2003) et des réductions de la sensibilité à l'insuline (Davidowa et Plagemann, 2007) ou à leptine (Davidowa et Plagemann, 2000; Ferezou-Viala et al., 2007).

### *3.2.2. Conséquences d'un régime maternel hyperlipidique sur le comportement/ motivation alimentaire*

L'exposition à un régime maternel hyperlipidique augmente la consommation alimentaire des descendants adultes (Howie et al., 2009; Kirk et al., 2009). Il a été montré que des descendants de mères sous régime hyperlipidique présentent en plus d'une hyperphagie, une préférence pour des aliments riches en lipides (Walker et al., 2008). Dans une autre étude, les mères étaient nourries, pendant la gestation et la lactation, avec un régime standard additionné à des aliments de type « cafeteria » comme du fromage, des chips, du chocolat, etc. Au sevrage, les descendants mâles ont été exposés à ce même régime en choix avec un régime standard. Les descendants de mères ayant eu accès à des aliments de type « cafeteria » pendant la gestation et la lactation, consomment significativement plus de ces mêmes aliments par rapport à des descendants de mères sous régime standard de laboratoire (Bayol et al., 2007; Ong and Muhlhausler, 2011).

Cependant, une autre étude montre que l'exposition au régime maternel hyperlipidique est au contraire associée à une diminution de consommation d'un régime hyperlipidique à l'âge adulte (Couvreur et al., 2011).

Par ailleurs, il a été mis en évidence que le régime maternel hyperlipidique augmente la préférence au sucrose (Vucetic et al., 2010). Une étude, qui dissocie une récompense riche en lipides ou en sucre, a montré que des rats exposés à un régime maternel hyperlipidique, pendant la fin de la gestation et la lactation, présentent une augmentation de la motivation pour des pastilles palatables grasses mais pas pour des pastilles sucrées (Naef et al., 2011). Les divergences de résultats peuvent s'expliquer principalement par le type de régimes utilisé.

La **figure 5** représente les voies potentielles impliquées dans la vulnérabilité aux troubles métaboliques après une exposition précoce à un régime hyperlipidique.

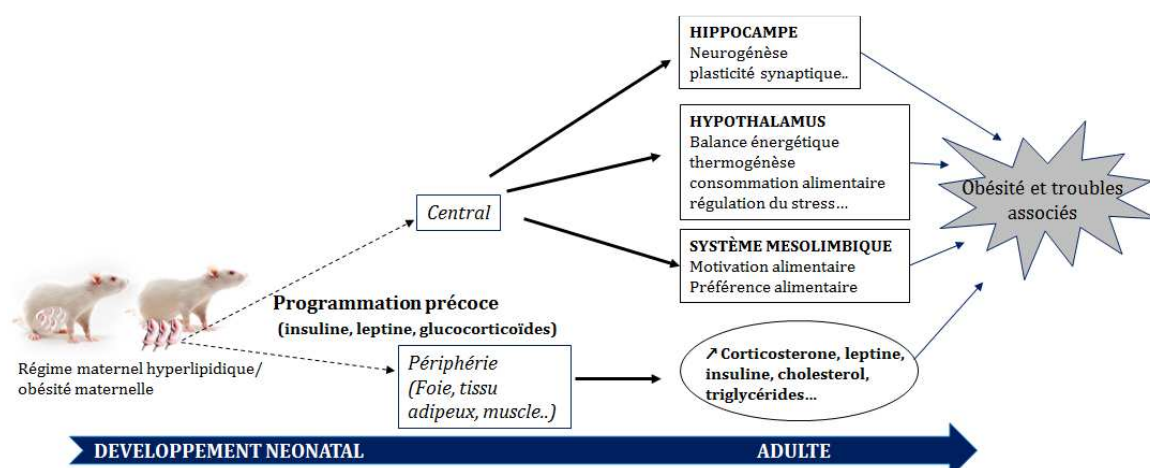


Figure 5: Schéma résumant les cibles et voies impliquées dans les effets à long terme d'un régime maternel hyperlipidique sur le développement de troubles métaboliques à l'âge adulte (adapté de Walker et al., 2008)

### 3.2.3. Conséquences d'un régime maternel hyperlipidique sur la sphère cognitivo-émotionnelle

Si beaucoup d'études se sont intéressées à l'impact de l'exposition précoce à un régime hyperlipidique sur le métabolisme, nettement moins ont examiné des conséquences sur la sphère cognitivo-émotionnelle.

Les seules études examinant l'impact du régime maternel hyperlipidique sur la mémoire spatiale montrent des effets différents. En effet, il a été montré que le régime maternel hyperlipidique entraîne des perturbations de la mémoire spatiale dans le labyrinthe aquatique de Morris (Page et al., 2014) et des altérations transitoires d'apprentissage dans le labyrinthe de Barnes (Tozuka et al., 2010). Cependant, une autre étude montre que le régime maternel hyperlipidique entraîne des perturbations de l'apprentissage spatial seulement si les descendants sont maintenus sous ce régime après le sevrage (White et al., 2009a). Et enfin, de manière surprenante, il a été mis en évidence que le régime maternel hyperlipidique augmente les capacités la mémoire spatiale lorsque le test de rétention est effectué 2h après la séance d'apprentissage (Bilbo et Tsang, 2010). En conclusion, malgré la divergence des résultats, il semble que le régime maternel hyperlipidique n'affecte pas de manière drastique les performances de mémoire spatiale.

Quelques travaux suggèrent que l'exposition à un régime précoce hyperlipidique peut influencer les comportements émotionnels. Ainsi, un régime maternel hyperlipidique a été associé avec une augmentation des comportements agressifs et une diminution de l'activité dans le test de la nage forcée (Giriko et al., 2013). Par ailleurs, un régime maternel hyperlipidique augmente les comportements de type anxieux dans le test de l'arène ouverte, que les descendants soient nourris avec un régime standard ou un régime hyperlipidique après le sevrage (Page et al., 2014). Des résultats similaires ont été observés chez rats exposés à un régime maternel hyperlipidique riches en acides gras *saturés* et *trans* dans le test du labyrinthe en croix surélevé (Bilbo et Tsang, 2010).

Cependant, une étude montre, qu'au contraire, l'exposition à un régime maternel hyperlipidique diminue les comportements de type anxieux dans le labyrinthe en croix surélevé ou n'a pas d'effet dans le test de l'arène ouverte (Wright et al., 2011). Ces divergences peuvent là encore s'expliquer par les différences de régimes utilisés ou de la période d'exposition. Cependant des travaux récents utilisant le même protocole, soulignent les difficultés d'établir des liens certains entre l'exposition précoce au régime hyperlipidique et les comportements émotionnels à l'âge adulte.

En effet, il a été mis en évidence qu'un régime maternel hyperlipidique pendant la période périnatale diminue les comportements de type anxieux dans le test de l'arène ouverte et du labyrinthe en croix surélevée, mais les augmente dans le test de la boîte noire et blanche (Sasaki et al., 2014). Cependant, une étude précédente de la même équipe avait montré une augmentation des comportements de type anxieux dans le test de l'arène ouverte, mais aucune modification dans les autres tests (Sasaki et al., 2013). En résumé, si le régime modifie les comportements émotionnels de la descendance, ces altérations semblent être subtiles et difficiles à mettre en évidence mais aussi dépendre des tests utilisés pour les évaluer.

### **3.3 Conséquences neurobiologiques et neuroendocrines de l'exposition précoce à un régime hyperlipidique**

L'exposition au régime maternel hyperlipidique entraîne des modifications pendant le développement. Ainsi, un régime prénatal hyperlipidique est associé à des retards du développement physiologique et neurocomportemental (Giriko et al., 2013) ainsi qu'à des perturbations développementales des neurones hypothalamiques chez l'embryon (Poon et al., 2012). Par ailleurs, cette exposition précoce au régime hyperlipidique entraîne des perturbations développementales du système sérotoninergique, en augmentant par exemple l'expression des récepteurs à la sérotonine 1A, dans les noyaux rostraux du Raphé chez des fœtus en 3<sup>ème</sup> trimestre de gestation (Sullivan et al., 2010).

Une étude chez la souris a montré que l'exposition à un régime maternel hyperlipidique entraîne une diminution la prolifération cellulaire (Tozuka et al., 2009), une réduction transitoire de l'expression de BDNF dans l'hippocampe et une diminution de l'arborisation dendritique neuronale pendant la période juvénile (Tozuka et al., 2010). Par ailleurs, un régime maternel hyperlipidique peut entraîner des effets neuroendocrines et neurobiologiques à long terme. Ainsi, les descendants de mères sous régime hyperlipidique présentent une diminution de corticostérone basale, associées à des modifications de l'expression des récepteurs MR (minéralocorticoïdes) et GR dans l'amygdale et l'hippocampe (Sasaki et al., 2014; Sasaki et al., 2013). Cependant, une autre étude rapporte, au contraire, une augmentation des taux



plasmatiques de corticostérone chez des descendants de mères nourries avec un régime de type cafeteria (Walker et al., 2008).

De plus, des travaux montrent que l'exposition à un régime périnatale hyperlipidique entraîne des altérations du système dopaminergique et opoïdes (Naef et al., 2011; Ong et Muhlhausler, 2011; Vucetic et Reyes, 2010) qui pourraient sous-tendre l'augmentation de la préférence ou de la motivation alimentaire.

**En conclusion, les effets du régime maternel hyperlipidique sur le métabolisme des descendants semblent dépendre du statut métabolique de la mère. Par ailleurs, ses effets sur la sphère cognitivo-émotionnelle sont très variables en fonction des types de régimes, de la durée pendant laquelle la mère est nourrie avec le régime, et de la nature des tests d'évaluation.**

## **Objectifs et hypothèses de travail**

## ***Objectifs et hypothèses de travail***

---

Le concept de programmation précoce suggère que l'environnement pendant les premières de phases de vie laisse une empreinte durable sur le phénotype de l'individu et influence sa santé future (Boersma et al., 2014).

**Chez l'homme, l'adversité dans l'enfance est l'un des facteurs qui affecte le plus le fonctionnement cérébral et la santé mentale à l'âge adulte.** Ainsi, des négligences ou des abus pendant l'enfance augmentent le risque de développer des troubles neuropsychiatriques tels que la dépression (Chapman et al., 2004; Felitti et al., 1998; Mullen et al., 1996; Noll et al., 2007). Par ailleurs, l'adversité précoce prédispose à l'obésité et aux troubles métaboliques (D'Argenio et al., 2009; Gunstad et al., 2006; Lissau et Sorensen, 1994). Cependant la notion d'adversité implique des sources de stress précoce multiples. A ce titre, nous assistons actuellement à des modifications de nos habitudes alimentaires et plus particulièrement à une augmentation de la consommation d'aliments à forte densité calorique, gras et sucrés. (Cordain et al., 2005; Kearney, 2010). Il est important de noter que ces changements d'habitudes alimentaires affectent aussi l'individu en développement et plus particulièrement les populations exposées à l'adversité. Or, on ne connaît pas l'impact à long terme de cet environnement nutritionnel sur le phénotype cognitivo-émotionnel à l'âge adulte. Par ailleurs, les contributions respectives et les potentielles interactions entre les changements nutritionnels et le stress précoce sur le fonctionnement cérébral à l'âge adulte ne sont pas connues.

**L'objectif général de ce travail de thèse a été de déterminer, à partir d'un modèle animal chez le rat, l'impact des facteurs précoces (nutrition maternelle hyperlipidique et stress) pendant la période périnatale sur la programmation du phénotype à l'âge adulte.**

**Dans une première partie, nous nous sommes intéressées aux effets d'un régime maternel hyperlipidique modélisant le régime occidental, sur le métabolisme et les fonctions cognitives des descendants à l'âge adulte.**

Chez l'animal, l'exposition à un régime périnatal hyperlipidique entraîne des modifications du comportement alimentaire ainsi qu'une augmentation du poids à l'âge adulte, pour revue (Sullivan et al., 2011). Certains travaux montrent qu'un régime maternel hyperlipidique exacerbe les comportements émotionnels ainsi que la réponse neuroendocrine au stress (Bilbo et Tsang, 2010; Page et al., 2014; Sasaki et al., 2014; Tozuka et al., 2010). Les travaux examinant l'impact d'un régime maternel hyperlipidique sur les fonctions mnésiques sont contradictoires et impliquent le plus souvent une obésité maternelle (Tozuka et al., 2010; White et al., 2009a). **Ainsi, la plupart des études ne permettent pas de dissocier les conséquences de l'obésité maternelle et celles du régime *per se* sur le comportement cognitivo-émotionnel des descendants.**

*Hypothèse : Au regard des effets de l'obésité maternelle sur le comportement de la descendance, nous émettons l'hypothèse que l'exposition à un régime précoce hyperlipidique entraîne des altérations émotionnelles et cognitives.*

**Dans une deuxième partie, nous sommes intéressées à l'impact du régime maternel hyperlipidique combiné à un stress précoce sur le phénotype de la descendance.**

Chez le rongeur, le modèle d'adversité précoce le plus utilisé est celui de la séparation maternelle, qui consiste à séparer, de manière chronique, les petits de la mère pendant la période postnatale. Ce modèle de stress précoce entraîne des conséquences à long terme sur les performances mnésiques, le comportement émotionnel et la réactivité au stress (Nishi et al., 2014). Certaines études montrent qu'une exposition à un régime hyperlipidique à l'âge adulte peut restaurer les conséquences délétères d'un stress chronique (Finger et al., 2011; Krolow et al., 2010; MacKay et al., 2014; Pecoraro et al., 2004). Des résultats similaires ont été observés dans le modèle de séparation maternelle. En effet, un régime hyperlipidique après le sevrage contrecarre les altérations comportementales induites par la séparation maternelle (Maniam et Morris, 2010b, c). **En revanche, l'impact à long terme d'un régime maternel hyperlipidique**

**pendant la période périnatale sur les effets de la séparation maternelle n'a encore jamais été étudié.**

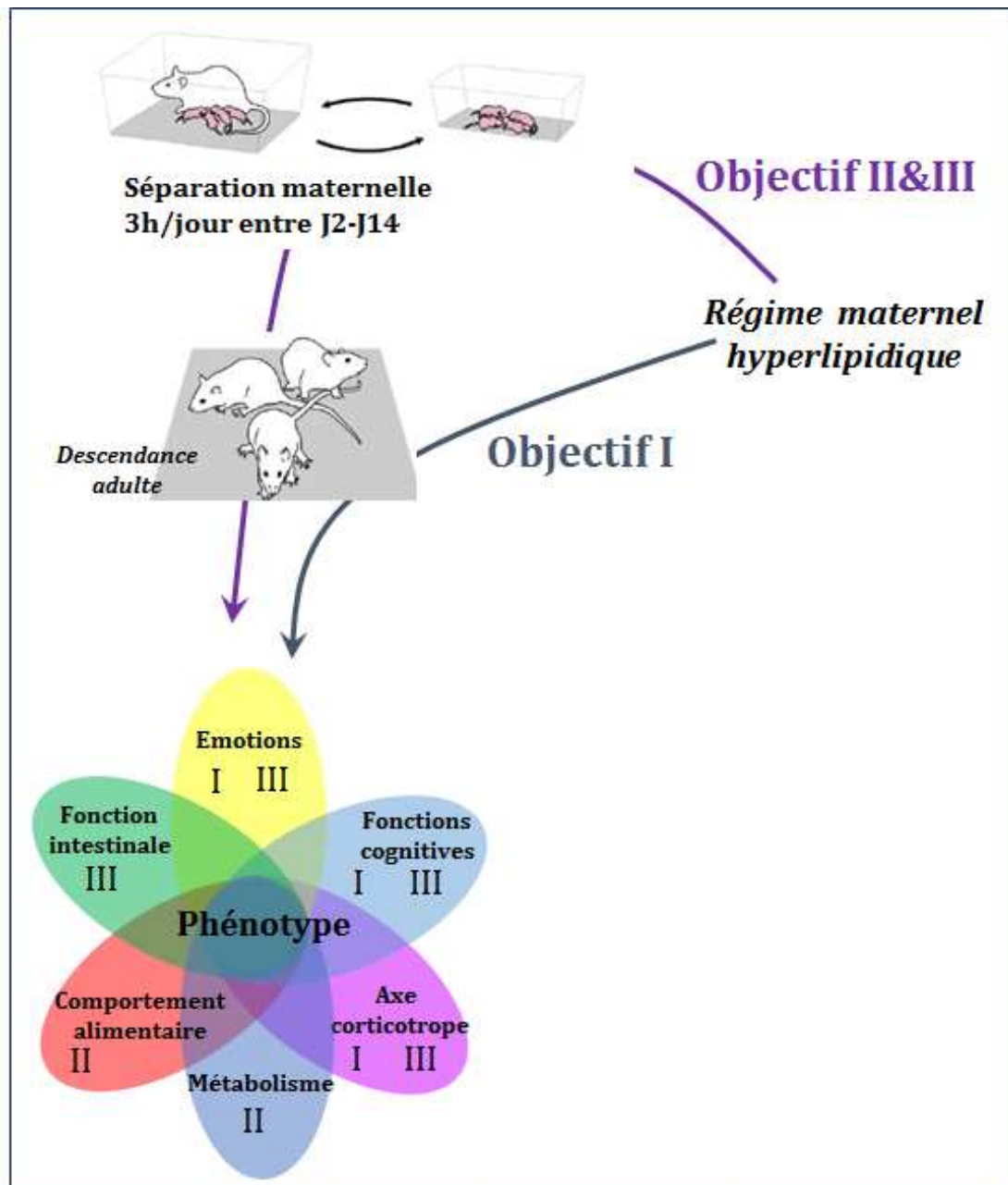
**Objectif 1 : Quel est l'impact d'un régime maternel hyperlipidique combiné au stress de séparation maternelle sur la réponse métabolique à des challenges nutritionnels et sur la motivation alimentaire ?**

*Hypothèse : Etant donné les conséquences communes du régime maternel hyperlipidique et de l'adversité précoce sur la vulnérabilité métabolique l'âge adulte, nous émettons l'hypothèse que la combinaison de ces deux facteurs exacerbe les troubles métaboliques et la prise de poids.*

**Objectif 2 : Quel est l'impact d'un régime maternel hyperlipidique combiné au stress de séparation maternelle sur le phénotype cognitivo-émotionnel de la descendance à l'âge adulte ?**

*Hypothèse : Le régime maternel hyperlipidique protège des effets délétères de la séparation maternelle.*

La **figure 6** regroupe les différents objectifs de ce travail de thèse.



**Figure 6: Schéma récapitulant les objectifs de ce travail de thèse:** Les I, II et III sur la rosace désignent les paramètres étudiés dans chacun des objectifs (*adapté de O'Mahony et al., 2011*).

## Résultats

## ***Partie I :***

### ***Impact d'un régime maternel hyperlipidique sur le phénotype comportemental et métabolique de la descendance adulte.***

#### **Objectifs**

Les sociétés actuelles font face à des changements d'habitudes alimentaires, et en particulier, à une augmentation de la consommation d'aliments à forte densité calorique, riches en lipides. Ces changements nutritionnels vont aussi affecter les femmes en âge de procréer, impactant ainsi indirectement l'individu en développement. Les conséquences de cette nutrition précoce hyperlipidique sur la programmation du phénotype comportemental et métabolique ne sont pas très connues. Des travaux chez l'animal ont montré qu'un régime maternel hyperlipidique est associé à une vulnérabilité aux troubles métaboliques, ainsi qu'à des altérations subtiles des comportements émotionnels et des performances cognitives, à l'âge adulte. Cependant, dans la plupart de ces études, les mères sous régime hyperlipidique développent un surpoids, du fait de la longueur de la période d'exposition ou du type de régimes hyperlipidiques. Par ailleurs, les régimes hyperlipidiques utilisés dans ces études, souvent riches en graisses animales, ne représentent pas vraiment les habitudes alimentaires des sociétés actuelles.

**Le but de cette étude était donc de déterminer les conséquences d'un régime périnatal hyperlipidique de type «western», indépendamment de l'obésité maternelle, sur le phénotype métabolique et comportemental de la descendance à l'âge adulte.**

#### **Matériel et méthodes**

Des femelles Wistar ont été nourries avec un régime standard (12% de lipides, 3,9kcal/g) ou un régime hyperlipidique (39% de lipides, 4,9kcal/g) pendant la gestation et la lactation. Au sevrage, les descendants mâles ont été nourris avec le régime standard ou maintenus sous régime hyperlipidique, aboutissant ainsi à un groupe de rats exposés



au régime hyperlipidique seulement pendant la période périnatale et un autre exposé à ce régime tout au long de la vie. A l'âge adulte, la mémoire spatiale a été évaluée dans le labyrinthe aquatique de Morris, et les comportements émotionnels, dans le test de la nage forcée. De plus, nous avons mesuré la réponse endocrine de ces descendants après un stress de contention. Après le sacrifice de ces rats, nous avons fait, dans l'hippocampe, des marquages immunohistochimiques de la *doublecortine*, afin d'évaluer la neurogénèse et d'un marqueur des astrocytes, *iba1* (Ionized calcium binding adaptor molecule 1), afin d'examiner leur morphologie. Par ailleurs, une analyse à grande échelle a permis d'analyser l'expression de 95 gènes dans l'hippocampe.

## Résultats

Les résultats obtenus lors de cette étude sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 4** : Bilan des effets du régime maternel hyperlipidique (HL) sur le phénotype comportemental et métabolique des descendants à l'âge adulte.

Paramètres	Régime périnatal HL	Régime périnatal HL + régime HL post sevrage
Mémoire spatiale	-	↘
Comportement de type dépressif	-	-
Réponse CORT au stress	-	-
Neurogénèse hippocampique	-	↘
Longueur des processus astrocytaires	↗	-
Poids	-	↗
Leptine	↗	↗↗
Cholestérol	↗	↗

« ↗ » et « ↘ » correspondant respectivement à une augmentation et une diminution du paramètre donné par rapport au groupe sous régime standard tout au long de la vie. « - » indiquant une absence d'effet.

## Discussion

Nous avons mis en évidence que l'exposition au régime maternel hyperlipidique entraîne une hypercholestérolémie ainsi qu'une augmentation de leptine plasmatique,

suggérant ainsi que le régime *per se*, indépendamment de l'obésité maternelle, peut programmer le phénotype métabolique de la descendance adulte. Par ailleurs, le régime maternel hyperlipidique est associé à des modifications d'expression de certains gènes dans l'hippocampe, comme Slc2a3, Dcx et InsR codant, respectivement, le transporteur du glucose 3, la doublecortine et le récepteur à l'insuline. Ainsi, il semble que le régime maternel hyperlipidique laisse une empreinte durable sur les profils d'expression de certains marqueurs clés, impliqués par exemple dans le métabolisme cellulaire. En revanche, nous n'avons observé aucun impact du régime maternel hyperlipidique sur la neurogénèse hippocampique. De plus, les comportements émotionnels et la mémoire spatiale des descendants ne sont pas affectés par l'exposition au régime maternel hyperlipidique.

En revanche, nous avons mis en évidence que si les descendants sont maintenus sous régime hyperlipidique après le sevrage, leurs performances de mémoire spatiale sont altérées. De plus, ces rats exposés au régime hyperlipidique tout au long de la vie présentent une diminution de la neurogénèse hippocampique ainsi qu'une diminution d'expression de gènes reliés à la transmission synaptique, qui pourraient sous-tendre leurs déficits de mémoire spatiale (Ferguson et al., 2000; Ferguson et al., 2004; Frick et Fernandez, 2003; Snyder et al., 2005; Zhao et al., 2008). Par ailleurs, ces rats exposés au régime hyperlipidique tout au long de la vie sont en surpoids, et présentent une augmentation du cholestérol ainsi qu'une augmentation importante de la leptine. Or, il a été proposé que les troubles métaboliques puissent être à l'origine des altérations des performances cognitives (Farr et al., 2008; Greenwood and Winocur, 1996; Stranahan et al., 2008). Afin de tester cette hypothèse, dans une expérience complémentaire, nous avons exposé des rats au régime hyperlipidique après le sevrage, ce qui a permis de mimer les altérations métaboliques observées chez les rats exposés au régime hyperlipidique tout au long de la vie. De manière intéressante, une exposition au régime hyperlipidique après le sevrage (*i.e* excluant la période périnatale) n'entraîne aucune altération de la mémoire spatiale. Ceci suggère donc que les altérations métaboliques observées chez les rats sous régime hyperlipidique en continu, ne sont pas totalement responsables de leurs déficits de mémoire spatiale.

Par ailleurs, alors que l'exposition au régime hyperlipidique pendant l'âge adulte, seule, n'a aucun effet, ce régime à l'âge adulte combiné à une exposition précoce entraîne des

modifications de la mémoire spatiale. Ceci suggère l'implication de l'exposition périnatale dans les effets délétères du régime hyperlipidique.

Ainsi, nous proposons que le régime périnatal hyperlipidique *per se* n'entraîne pas de déficits comportementaux majeurs, mais entraîne de subtiles altérations qui peuvent ensuite aboutir à l'émergence de déficits mnésiques lors d'une réexposition au régime hyperlipidique à l'âge adulte. La transition vers un régime standard au sevrage pourrait atténuer les effets délétères d'une exposition précoce au régime maternel hyperlipidique, entraînant ainsi une absence de déficits des performances mnésiques. Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces animaux exposés au régime maternel hyperlipidique présentent une vulnérabilité sous-jacente persistante qui pourrait s'exprimer au cours du vieillissement ou dans des situations de stress, et entraîner des déficits comportementaux.

## **Conclusion**

Notre travail a permis de souligner l'importance de l'environnement nutritionnel pendant les phases précoces du développement. En effet, nous avons mis en évidence que la nutrition périnatale hyperlipidique, indépendamment de l'obésité maternelle, peut avoir des effets à long terme sur le phénotype métabolique ; et entraîner une vulnérabilité comportementale dans une situation de réexposition à ce régime à l'âge adulte.



# Perinatal high-fat diet increases hippocampal vulnerability to the adverse effects of subsequent high-fat feeding

Amandine L. Lépinay<sup>a,b</sup>, Thomas Larrieu<sup>a,b</sup>, Corinne Joffre<sup>a,b</sup>,  
Niyazi Acar<sup>c,d,e</sup>, Iciar Gárate<sup>a,b</sup>, Nathalie Castanon<sup>a,b</sup>,  
Guillaume Ferreira<sup>a,b</sup>, Bénédicte Langelier<sup>h</sup>, Philippe Guesnet<sup>i</sup>,  
Lionel Brétillon<sup>c,d,e</sup>, Patricia Parnet<sup>f,g</sup>, Sophie Layé<sup>a,b,1</sup>,  
Muriel Darnaudéry<sup>a,b,\*,1</sup>

<sup>a</sup> INRA, Nutrition et Neurobiologie Intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux, France

<sup>b</sup> Université de Bordeaux, Nutrition et Neurobiologie Intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux, France

<sup>c</sup> CNRS, UMR 6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, 21000 Dijon, France

<sup>d</sup> INRA, UMR 1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, 21000 Dijon, France

<sup>e</sup> Université de Bourgogne, UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, 21000 Dijon, France

<sup>f</sup> INRA, UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, 44093 Nantes, France

<sup>g</sup> Université de Nantes, UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, 44093 Nantes, France

<sup>h</sup> INRA, Nutrition et Régulation Lipidique des Fonctions Cérébrales, UR909, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

<sup>i</sup> PG Consulting, 13 Villa Bellevue, 91440 Bures sur Yvette, France

Received 14 October 2014; received in revised form 5 December 2014; accepted 5 December 2014

## KEYWORDS

Memory;  
Hippocampus;

**Summary** Epidemiological observations report an increase in fat consumption associated with low intake of n-3 relative to n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in women of childbearing age. However, the impact of these maternal feeding habits on cognitive function in the offspring is unknown. This study aims to investigate the impact of early exposure to a high-fat diet (HFD)

**Abbreviations:** AUC, area under the curve; C–C, control diet throughout life; C–HF, perinatal control diet and high-fat diet at weaning; DCX, doublecortin; DMA, dimethylacetate; DNMT, DNA methyltransferase; FAs, fatty acids; GD, gestational day; GFAP, glial fibrillary acid protein; HF–C, perinatal high-fat diet and control diet at weaning; HFD, high-fat diet; HF–HF, high-fat diet throughout life; PND, postnatal day; PP, post partum; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; TLDA, TaqMan low-density array.

\* Corresponding author at: University of Bordeaux, Lab NutriNeuro, UMR INRA 1286, 146 rue Léo Saignat, Case 34, 33076 Bordeaux cedex, France. Tel.: +33 5 57 57 12 32; fax: +33 5 57 57 12 27.

E-mail address: [muriel.darnaudery@u-bordeaux.fr](mailto:muriel.darnaudery@u-bordeaux.fr) (M. Darnaudéry).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.12.008>

0306-4530/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Omega-3 fatty acid;  
Omega-6 fatty acid;  
Water maze;  
TaqMan low-density  
array

with an unbalanced n-6/n-3 PUFAs ratio on hippocampal function in adult rats. Furthermore, we explored the effects of perinatal HFD combined with exposure to HFD after weaning. Dams were fed a control diet (C, 12% of energy from lipids, n-6/n-3 PUFAs ratio: 5) or HFD (HF, 39% of energy from lipids, n-6/n-3 PUFAs ratio: 39) throughout gestation and lactation. At weaning, offspring were placed either on control (C–C, HF–C) or high-fat (HF–HF) diets. In adulthood, hippocampus-dependent memory was assessed using the water-maze task and potential hippocampal alterations were determined by studying PUFA levels, gene expression, neurogenesis and astrocyte morphology. Perinatal HFD induced long-lasting metabolic alterations and some changes in gene expression in the hippocampus, but had no effect on memory. In contrast, spatial memory was impaired in animals exposed to HFD during the perinatal period and maintained on this diet. HF–HF rats also exhibited low n-3 and high n-6 PUFA levels, decreased neurogenesis and downregulated expression of several plasticity-related genes in the hippocampus. To determine the contribution of the perinatal diet to the memory deficits reported in HF–HF animals, an additional experiment was conducted in which rats were only exposed to HFD starting at weaning (C–HF). Interestingly, memory performance in this group was similar to controls. Overall, our results suggest that perinatal exposure to HFD with an unbalanced n-6/n-3 ratio sensitizes the offspring to the adverse effects of subsequent high-fat intake on hippocampal function.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

According to the hypothesis of the fetal origin of adult health, the early nutritional environment has long-term effects on later vulnerability to certain diseases (Barker et al., 1993). In western countries, the majority of the population, including childbearing women and children, consumes an excess of fat and high levels of n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) relative to n-3 PUFAs, resulting in an unbalanced n-6/n-3 PUFAs ratio (Cordain et al., 2005; Simopoulos, 2011). This ratio can reach 50 in some developing countries (India urban) instead of 5 as recommended (Simopoulos, 2011). While it has been proposed that the quantity and quality of fatty acids supplied by the maternal diet could influence child neurodevelopment (Bernard et al., 2013), the experimental evidence is limited. Animal models suggest that maternal consumption of a high-fat diet (HFD) could affect hippocampal function (Niculescu and Lupu, 2009; Tozuka et al., 2009) and spatial memory in offspring (Bilbo and Tsang, 2010; Page et al., 2014; Tozuka et al., 2010). However, the behavioral results are not consistent, and maternal HFD is variably linked with transient deleterious effects on memory (Page et al., 2014; Tozuka et al., 2010), no effect (White et al., 2009) or even memory improvement in the offspring (Bilbo and Tsang, 2010). Additionally, in all previous studies, the dams were kept on HFD for long periods, until they reached overweight status. Thus, the effects of maternal HFD per se, independent of maternal obesity, on the offspring's cognitive status remains unknown. Previous studies also used lard as the main source of fat for the HFD, and the type of PUFAs used was not taken into consideration. This question is particularly important given that several studies underline the importance of the nature of the fat (in particular the n-6/n-3 PUFAs ratio) in the long-term consequences of HFD on brain (Simopoulos, 2011). Furthermore, over the past few decades, in western countries, the consumption of fat from animal sources has decreased while there is an increasing consumption of fat from vegetal oils (Blasbalg et al., 2011). The consequences of these nutritional habits during development on

brain function in adulthood remains to be explored. In the present study, we aimed to determine the impact of perinatal (during gestation and lactation) exposure to HFD with an unbalanced n-6/n-3 PUFAs ratio on hippocampal function in adult rats. We exposed dams during pregnancy and lactation to a diet containing 39% of energy from lipids (vegetable oils) and with an n-6/n-3 PUFA ratio of 39. A group of animals was also exposed to maternal HFD but kept on the same diet after weaning. We investigated whether HFD affected hippocampus-dependent spatial memory. To characterize the impact of HFD on the hippocampus, we conducted large-scale gene expression profiling using a TaqMan low-density array (TLDA, 95 genes tested). We also examined neurogenesis as an important index of hippocampal function in adult animals (Cameron and Glover, 2015). Previous studies demonstrate that HFD modulates astrocytes function (Camargo et al., 2012) and their morphology (Cano et al., 2015). Recent data also indicate that n-3 PUFAs 3 diets restore age-related impairments of the spatial memory and astrocytes morphology in the hippocampus (Labrousse et al., 2012), we thus explored the impact of HFD on the number and the length of astrocytes processes. Moreover, since cognitive impairments could be due to emotional disturbances, we controlled for stress responses and depressive-like behavior in adult rats. Finally, to determine the contribution of the perinatal diet to the effects reported in animals exposed to HFD from conception until adulthood, an additional follow-up experiment was conducted in which rats were only exposed to HFD starting at weaning.

## 2. Methods

### 2.1. Animals and diets

Animals were maintained in a 12h/12h light:dark cycle at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  with free access to food and water. Experiments were carried out in accordance with French (Directive 87/148, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche) and

European (Directive 2010/63/EU, 2010 September 22th) legislation and approved by Institutional Regional Committee for animal experimentation (agreement# 5012050-A). Every effort was made to minimize suffering and the number of animals used. Nulliparous female Wistar rats (Charles River, France) were placed with males overnight for mating and vaginal smears were collected in order to detect the presence of sperm. Female rats were then singly housed and randomly assigned to control (C) or high-fat (HF) diet groups. The diets were prepared by the Experimental Foods Preparation Unit (Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, France). The composition of the diets is described in the Supplementary Table S1. A mixture of vegetable oils was used as the source of fat (C, 12% and HF, 39% of energy from fat). The n-6/n-3 PUFAS ratio of the HF diet was 39, while the C diet contained the recommended ratio of 5 (Supplementary Table S2). At birth, pups were weighed and litters culled to 8 pups. Offspring were weaned on post-natal day (PND) 21, housed four per cage and maintained until the end of the experiment (at 5 months of age) on C or HF diets in order to obtain 3 experimental groups (C–C), (HF–C) and (HF–HF). Only male offspring were used. Three different batches were used: one for the water maze and the immunohistochemistry in the hippocampus ( $n = 36$  rats), one batch for the metabolic markers and the biochemical analysis in the hippocampus (fatty acids levels determination and TLDA) ( $n = 30$  rats) and one batch for the forced swim test and the hormonal response to restraint stress ( $n = 36$  rats). To avoid a litter effect, a maximum of two siblings per group were used for each batch of animals.

## 2.2. Spatial learning and memory in the water maze

The apparatus consisted of a pool (150 cm diameter  $\times$  60 cm height) filled with opaque water ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). The platform (10 cm diameter) was positioned 3 cm below the surface of the water. Six sessions (four trials per day) were conducted to examine spatial learning, during which the latency and distance covered to reach the hidden platform were recorded (Darnaudery et al., 2007). Each session consisted of four successive trials and each trial began with the rat placed pseudo-randomly in one of four starting locations. If the rat did not find the platform after 90 s, it was guided to the platform. Animals were then given 48 h of retention time and were tested for reference memory during a 60 s probe trial without the platform. During the probe trial, crossings over the target area was recorded. The swim paths were videotracked (Smart, BIOSEB, Chaville, France).

## 2.3. Tissues collection and blood sampling

For immunohistochemistry studies, rats were anesthetized and then perfused with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) followed by 4% paraformaldehyde (PFA). After removal, brains were post-fixed in PFA for 24 h, cryoprotected in 30% sucrose, snap-frozen in isopentane and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Brains were then cut into  $40\ \mu\text{m}$  coronal sections using a cryostat and stored in a cryoprotectant solution until use. For biochemical analysis and plasma metabolic markers assays, after an overnight fast, rats deeply anesthetized

with Pentobarbital (50 mg/kg), were decapitated. Blood samples were collected on EDTA and centrifuged at  $2500 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . Plasma was then frozen at  $-80^\circ\text{C}$ , until the assessment. Hippocampi, frontal cortex and hypothalamus were rapidly dissected on ice and snap frozen to be further used for fatty acids composition or gene expression studies by TLDA.

## 2.4. Biochemical analyses in the hippocampus

### 2.4.1. Immunohistochemistry

Adult neurogenesis was examined by immunolabeling for doublecortin (Dcx), a marker of newborn immature neurons, using anti-DCX antibody (1:1000) (goat monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and a biotinylated donkey anti-goat secondary antibody (1:200) (Jackson Immuno Research Laboratories Inc, West Grove, PA, USA), as previously described (Boitard et al., 2012). To study the morphology of astrocytes, a fluorescent double-immunolabeling of mature neurons and astrocytes was performed as previously described (Labrousse et al., 2012). A mouse monoclonal anti-NeuN (1/1000; Chemicon, Temecula, CA, USA) and a goat polyclonal anti-GFAP (1:1000; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) were used as primary antibodies and AlexaFluor 594-conjugated goat anti-rabbit (1/2000) and AlexaFluor 488-conjugated donkey anti-mouse IgG (1:2000) (both from Invitrogen Life Sciences, Carlsbad, CA, USA) as secondary antibodies. Sections were then washed and mounted with Vectashield fluorescent mounting medium. Quantification of the number of Dcx-positive cells was done in two hippocampal sections (Bregma:  $-2.45\text{ mm}$ ;  $-3.25\text{ mm}$ , according to the Paxinos and Watson (1982)). All positive cells were counted in the granule cell layer of the dentate gyrus (DG) using a  $40\times$  objective on an Olympus BX51 microscope by an experimenter blind to the experimental conditions. Results are expressed as the mean number of cells per  $\text{mm}^2$ . One rat was excluded from the analysis due to technical complications.

To analyze astrocyte morphology, a series of images was captured from two hippocampal sections per rat (Bregma:  $-2.45\text{ mm}$ ;  $-3.25\text{ mm}$ ) in the hippocampal DG, CA1 and CA3 with an interval of  $0.1\ \mu\text{m}$  in the z-axis using a  $63\times$  oil-immersion lens. Images were acquired with an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E400, Nikon, Champigny-Sur-Marne) equipped with a Hamamatsu digital camera, piezoelectric z-axis controller and NIS-Elements Advanced Research 3.0 software (Nikon). Astrocytes were then reconstructed using the 3D-reconstruction software IMARIS (v.64.7.0.0 Bitplane AG, Zurich, Switzerland). 20 GFAP positive cells per rat with clear cell bodies and processes in the different regions were reconstructed. Morphometric parameters obtained with the 'filament tracer' program were: number, length and diameter of astrocytic processes and summed process volume. One rat was considered as an outlier and excluded from the analysis.

### 2.4.2. Fatty acid composition

We determined the fatty acid composition of phosphatidylethanolamine, one of the richest phospholipid classes among the PUFAs. Lipids were extracted from the hippocampi and assay was conducted as previously described



(Harbeby et al., 2012). Briefly, phosphatidylethanolamine was separated by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges, then transmethylated using boron trifluoride in methanol, and fatty acid methyl esters were analyzed by gas chromatography. Fatty acid methyl esters and DMAs were identified by comparison with commercial and synthetic standards. Data were processed using the EZChrom Elite software (Agilent Technologies, Massy, France) and reported as a percentage of total fatty acids.

#### 2.4.3. TLDA

The quantification of mRNA levels of 95 key genes in the hippocampus, hypothalamus and frontal cortex was achieved using RT-PCR based on TaqMan gene expression assays with predesigned TaqMan primers and probes for the rat (Assays-on-Demand™, Gene Expression Products; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as previously described (Coupe et al., 2010). The TaqMan probe and primer sets for each gene were selected from predesigned TaqMan gene expression assays. The most common name of the genes encoding key transporters and enzymes involved in brain energy metabolism, inflammatory and metabolic mediators and plasticity markers are listed in the Supplementary Table S3. The expression values of target genes ( $n=3$  per group) were calculated based on the comparative threshold cycle (Ct) method: they were first normalized to the expression level of 18S rRNA to generate  $\Delta$ Ct values. Thereafter, they were normalized to a calibrator (control diet) to obtain  $\Delta\Delta$ Ct values. The fold change was calculated using the formula  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Genes showing poor or late amplification ( $n=3$ ) were excluded from the analysis.

### 2.5. Hormonal assays

#### 2.5.1. Metabolic markers

Plasma levels of glucose, triglycerides and cholesterol were determined using a colorimetric enzymatic assay (Glucose RTU™, Triglyceride PAP 150™ kits, Cholesterol RTU™ BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). The lower limits of detection were 0.013 g/L (glucose), 0.14 g/L (triglycerides) and 0.081 g/L (cholesterol). Plasma levels of insulin and leptin were measured using ELISA kits for rat/mouse insulin and rat leptin (LINCO Research, St. Charles, MO, USA). For triglycerides measurements, one rat was excluded as an outlier.

#### 2.5.2. Plasma corticosterone levels after restraint stress

Rats were exposed to 30-min restraint stress in a transparent cylinder under bright light. Blood was collected from the tail vein in tubes containing EDTA immediately after the rat was placed in the restrainer (less than 2 min after removal from the home cage, for basal levels), and 30, 60 and 120 min after the start of the stress. The blood was centrifuged (4000 rpm for 15 min at 4°C) and aliquoted plasma samples were stored at -80°C until assay. Total plasma corticosterone level was measured by in-house radioimmunoassay (Minni et al., 2014). The average intra-assay and interassay coefficients of variation were respectively 9% and 10%.

**Table 1** Body weight of dams and pups.<sup>a</sup>

	C	HF
Weight of dams (g)		
On gestational day 21 (GD21)	470.7 ± 14.2	482.0 ± 9.1
On postpartum day 21 (PP21)	333.2 ± 5.7	349.5 ± 6.3
Weight of pups (g)		
At birth	6.8 ± 0.1	6.6 ± 0.1
At weaning	74.7 ± 1.6	86.4 ± 1.5***

<sup>a</sup> Data represent means ± SEM. C litters:  $n=7$  and HF litters:  $n=15$ . One-sample Student's  $t$  test, dams: GD21,  $t_{(20)}=0.69$ ,  $p=0.50$ ; PP21,  $t_{(20)}=1.60$ ,  $p=0.12$ . Pups: birth,  $t_{(20)}=1.37$ ,  $p=0.19$ ; weaning,  $t_{(20)}=4.90$ . \*\*\*  $p<0.001$ .

### 2.6. Spatial memory in rats exposed to HFD with an unbalanced n-6/n-3 ratio after weaning

In order to specify the contribution of perinatal HFD to the effects on spatial memory reported in the HF-HF group, an additional experiment was conducted with HFD starting at weaning (i.e. excluding the perinatal period). Breeding procedures were similar to those described above. Dams were fed the control diet during gestation and lactation. At weaning, male offspring were randomly assigned to either the control diet (C-C) or the HFD (C-HF). At 5 months of age, spatial learning and memory were assessed in the Morris water maze as previously described. Rats were then sacrificed, blood samples were collected to determine plasma leptin levels and hippocampi were dissected to analyze hippocampal fatty acid composition.

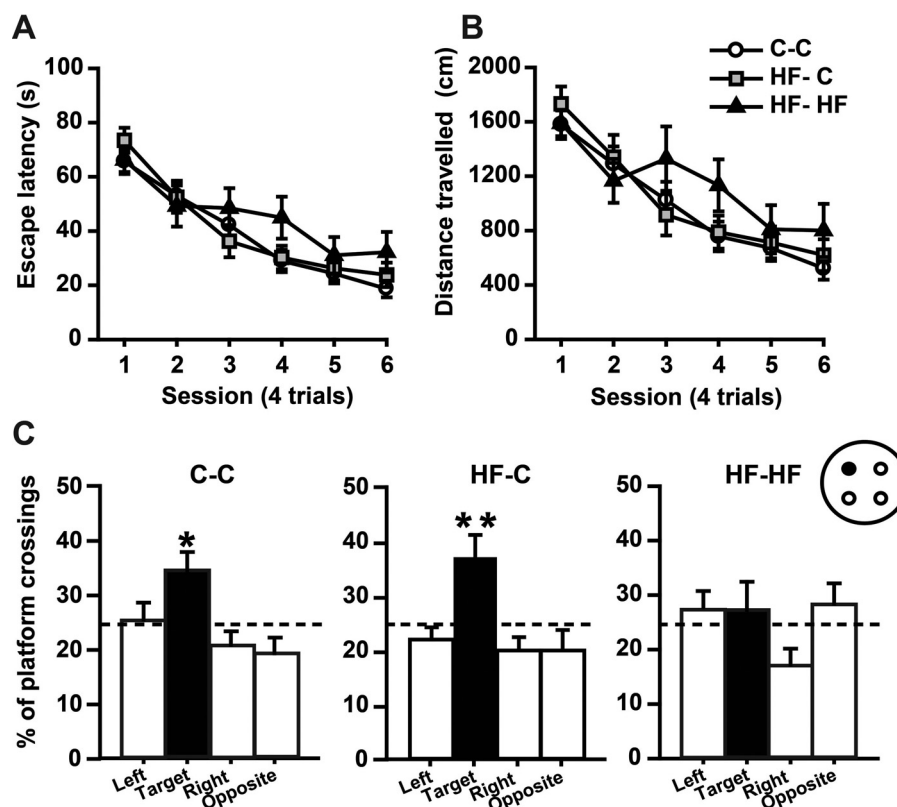
### 2.7. Statistical analysis

Values are expressed as means ± SEM. All data were analyzed using Statistica 6.0. Normality was assessed by using Shapiro-Wilk tests. Significance was tested using ANOVA followed by Fisher LSD post hoc analysis. The water maze probe data were analyzed by within group ANOVA and one sample  $t$ -test against chance level (i.e. 25%) to assess zone effect as previously described (Remondes and Schuman, 2004). Data obtained from TLDA were analyzed using BRB-assay Tools (Simon et al., 2007). An analysis of genes that were differentially expressed among the 3 groups was performed using a univariate  $F$  test followed by multivariate permutation tests. For TLDA, the significance level chosen was  $p<0.01$ . C and HF groups, as well as C-C and C-HF were compared using unpaired Student's  $t$  tests. For all analyses, differences were considered significant at  $p<0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Effects of HFD with an unbalanced n-6/n-3 ratio on dams and pups body weight

The mean body weight (Table 1) of HFD-fed dams was similar to that of control-diet-fed dams at the end of pregnancy and



**Figure 1** Impact of HFD with an unbalanced n-6/n-3 ratio on spatial memory performance in the water maze task. Escape latency (A), distance traveled (B) to reach the hidden platform over 6 sessions of learning and percentage of crossings over the platform area during the probe trial with a 48 h retention delay (C) in adult C–C, HF–HF and HF–C rats ( $n = 12$  per group). The dotted line represents the probability of chance crossings (i.e. 25%). During the learning phase, there was a significant session effect in escape latency ( $F_{(5,165)} = 40.62$ ,  $p < 0.001$ ) and distance traveled ( $F_{(5,165)} = 30.69$ ,  $p < 0.001$ ) but no difference between groups. During the probe test, there was a significant zone effect ( $F_{(3,99)} = 7.27$ ,  $p < 0.001$ ), but no significant interaction zone  $\times$  group. Subsequent analysis comparing target zone exploration within groups revealed significant zone effect in C–C rats ( $F_{(3,33)} = 4.09$ ,  $p = 0.01$ ) and HF–C ( $F_{(3,33)} = 6.16$ ,  $p = 0.002$ ), but not in HF–HF ( $F_{(3,33)} = 1.42$ ,  $p = 0.25$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. chance.

lactation. HF–C rat pups exhibited a transient increase in body weight at weaning ( $p < 0.001$ ).

### 3.2. Effect of HFD with an unbalanced n-6/n-3 ratio on spatial memory performance in adult offspring

During acquisition, all groups of adult offspring showed similar improvements of performances as revealed by the decrease in the escape latency and the distance traveled, indicating intact spatial learning abilities (Fig. 1A and B). An ANOVA for repeated measures revealed a training-session effect on latency and distance (both,  $p < 0.001$ ) but no effect of diet. To assess reference memory, 48 h after the last training session, a probe trial was performed. C–C and HF–C rats crossed the target zone more often than expected by chance alone (respectively,  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ) (Fig. 1C). However, HF–HF rats failed to show a preference for the platform zone ( $p = 0.25$ ), suggesting a spatial memory deficit in this group. The visible platform test was performed to assess the visual and motor acuity of rats. The mean latency to reach the visible platform was

similar between groups (data not shown). Since HFD has been suggested to exacerbate passive coping strategy in rats (Abildgaard et al., 2011), memory impairments in the water maze could be due to emotional disturbances, in HF–HF rats. Therefore, we controlled for immobility in the forced swim test (see Supplementary Information for methods). The immobility score in the forced swim test was similar across groups (C–C:  $12.2 \pm 1.4$ , HF–C:  $13.5 \pm 1.6$ , HF–HF:  $12.8 \pm 1.4$ ).

### 3.3. Effect of HFD with an unbalanced n-6/n-3 ratio on metabolism and corticosterone levels after restraint stress in adult offspring

Perinatal HFD exposure had no impact on the daily food intake in adulthood, in contrast HF–HF rats showed higher food consumption (in kcal, C–C:  $89.7 \pm 1.6$ ; HF–C:  $93.8 \pm 3.3$  and HF–HF:  $108.8 \pm 2.5$ ; ANOVA  $F_{(1,28)} = 12.99$ ,  $p < 0.001$ , HF–HF vs. other groups,  $p < 0.001$ ). In adulthood (Table 2), despite the lack of change in body weight, HF–C offspring had higher cholesterol ( $p = 0.007$ ) and leptin levels ( $p = 0.02$ ) compared to C–C offspring. As expected,



**Table 2** Body weight, plasma glucose, insulin, triglyceride, cholesterol, leptin levels and area under the curve (AUC) of plasma corticosterone in response to restraint stress in adult rats fed a control diet (C–C), a high-fat diet restricted to the perinatal period (HF–C) or a high-fat diet from conception to adulthood (HF–HF).<sup>a</sup>

	C–C	HF–C	HF–HF
Body weight (g)	476 ± 8.8	488 ± 6.6	536 ± 13.2*,#
Glucose (g/L)	1.0 ± 0.04	1.0 ± 0.04	1.1 ± 0.04
Insulin (ng/mL)	1.6 ± 0.26	2.0 ± 0.30	2.4 ± 0.36
Triglycerides (g/L)	1.2 ± 0.18	1.4 ± 0.10	1.6 ± 0.13
Cholesterol (g/L)	0.6 ± 0.04	0.8 ± 0.04*	0.8 ± 0.03*
Leptin (ng/mL)	3.0 ± 0.50	6.5 ± 0.91*	10.5 ± 1.38*,#
Corticosterone (AUC)	3732.1 ± 445.4	3758.4 ± 404.6	3051.8 ± 299.4

<sup>a</sup> Data represent means ± SEM.  $n=9-12$  per group. One-way ANOVA, body weight,  $F_{(2,33)}=10.14$ ,  $p<0.001$ , glucose,  $F_{(2,27)}=0.69$ ,  $p=0.51$ ; insulin,  $F_{(2,27)}=1.66$ ,  $p=0.21$ ; triglycerides,  $F_{(2,26)}=1.85$ ,  $p=0.18$ ; cholesterol,  $F_{(2,27)}=5.38$ ,  $p=0.01$  and leptin,  $F_{(2,27)}=14.20$ ,  $p<0.001$ ; corticosterone,  $F_{(2,33)}=2.59$ ,  $p=0.09$ .

At least \* $p<0.05$  vs. C–C; # $p<0.05$  vs. HF–C.

HF–HF offspring displayed higher body weight and plasma leptin levels compared to C–C (respectively,  $p=0.008$  and  $p<0.001$ ) and HF–C offspring (respectively,  $p=0.02$  and  $p=0.009$ ). They also exhibited plasma cholesterol levels that were significantly higher than those of C–C rat offspring ( $p=0.01$ ), but not significantly different those of HF–C offspring. 12 h fast plasma glucose, insulin and triglyceride levels did not differ between groups. Although the area under the curve (AUC) for the corticosterone in response to restraint stress was not significantly different among the 3 groups ( $p=0.09$ ), HF–HF showed a significant blunted response to stress in comparison to the C–C group ( $t_{(22)}=2.24$ ,  $p=0.03$ ).

### 3.4. Impact of HFD with an unbalanced n-6/n-3 ratio on hippocampus in adult offspring

#### 3.4.1. Fatty acid composition of phosphatidylethanolamine

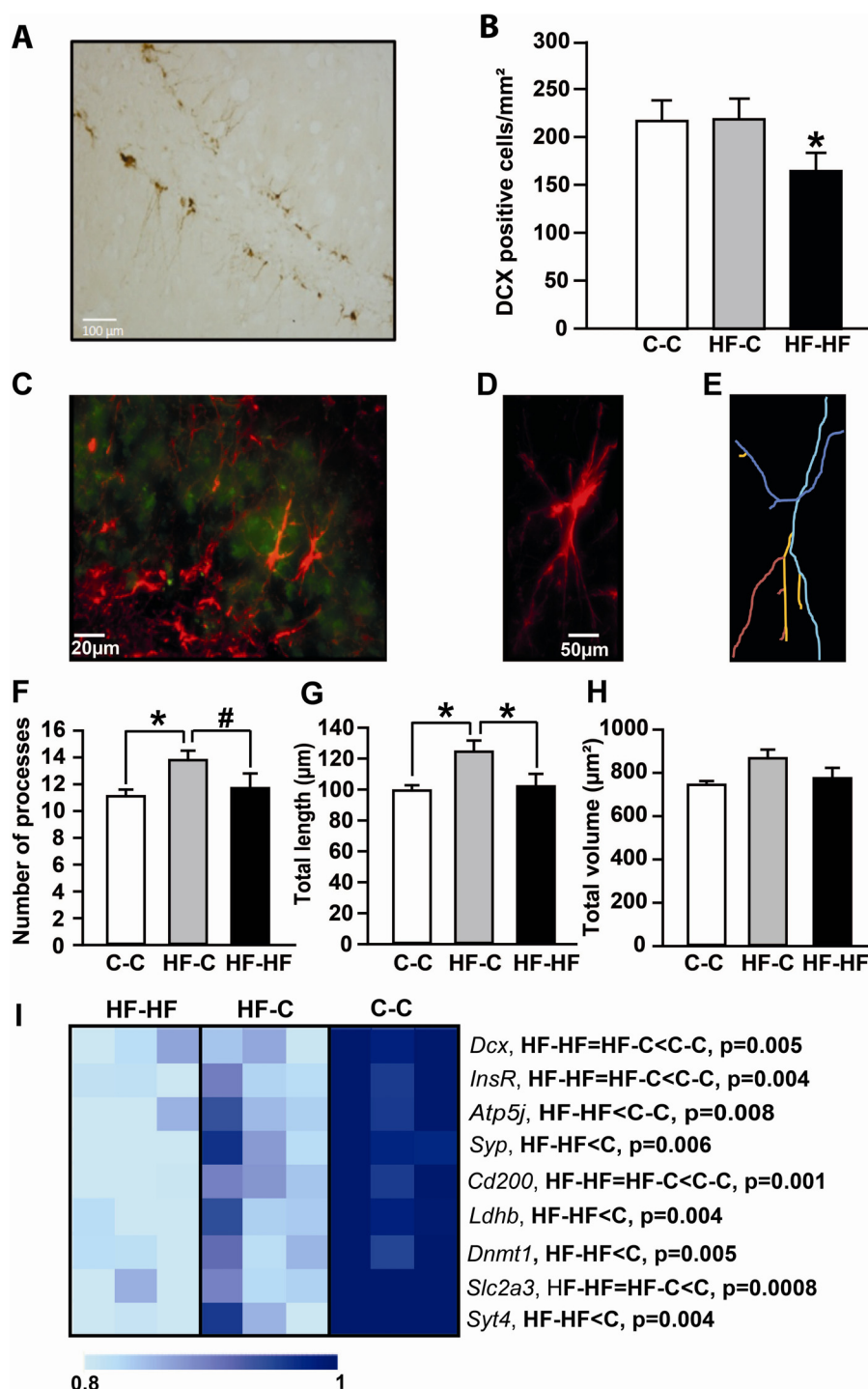
HF–C rats showed a global reduction in hippocampal PUFA content as compared to C–C ( $p=0.02$ ) and HF–HF ( $p=0.02$ ) rats. This decrease was mainly attributable to a decrease in arachidonic acid (20:4 n-6) ( $p=0.01$  vs. C–C, and  $p=0.02$  vs. HF–HF). In contrast, HF–HF rats exhibited increased hippocampal n-6 PUFAs ( $p<0.001$ ) and reduced n-3 PUFAs (respectively,  $p<0.001$  and  $p=0.003$ ) as compared to C–C and HF–C rats (Table 3). The gain in n-6 PUFAs was due

**Table 3** Fatty acid (FA) composition of phosphatidylethanolamine in the hippocampus of adult rats fed a control diet (C–C), a high-fat diet restricted to the perinatal period (HF–C) or a high-fat diet from conception to adulthood (HF–HF).<sup>a</sup>

	C–C	HF–C	HF–HF
Saturated FAs	20.7 ± 0.5	22.3 ± 0.8	21.3 ± 0.8
Monounsaturated FAs	11.7 ± 0.6	12.4 ± 0.6	11.2 ± 0.7
Polyunsaturated FAs	46.3 ± 1.0	43.1 ± 1.0*	46.2 ± 0.7
n-6 PUFAs	22.9 ± 0.7	20.8 ± 0.5*	26.8 ± 0.4*
C20:4 n-6	15.6 ± 0.7	13.5 ± 0.5*	15.4 ± 0.4
C22:4 n-6	5.8 ± 0.3	5.5 ± 0.1	5.6 ± 0.1
C22:5 n-6	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1	5.3 ± 0.2*
Other n-6 PUFAs	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1
n-3 PUFAs	23.0 ± 0.3	21.6 ± 0.6	19.1 ± 0.5*
C22:5 n-3	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0*
C22:6 n-3	22.7 ± 0.4	21.3 ± 0.6	18.8 ± 0.4*
Other n-3 PUFAs	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1
Other PUFAs	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.1*	0.3 ± 0.1
DMA	21.3 ± 0.4	22.2 ± 0.4	21.3 ± 0.3
n-6/n-3 PUFA ratio	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.4 ± 0.0*

<sup>a</sup> Fatty acid composition is expressed as percentage of total fatty acids, mean ± SEM ( $n=5-6$  per group). FAs: fatty acids; PUFAs: polyunsaturated fatty acids; DMA: dimethylacetal. One-way ANOVA, saturated FAs,  $F_{(2,14)}=1.28$ ,  $p=0.31$ ; monounsaturated FAs,  $F_{(2,14)}=0.93$ ,  $p=0.42$ ; polyunsaturated FAs,  $F_{(2,14)}=4.50$ ,  $p=0.03$ ; n-6 PUFAs,  $F_{(2,14)}=30.98$ ,  $p<0.001$ ; C20:4 n-6,  $F_{(2,14)}=5.36$ ,  $p=0.01$ ; C22:4 n-6,  $F_{(2,14)}=1.10$ ,  $p=0.36$ ; C22:5 n-6,  $F_{(2,14)}=294.23$ ,  $p<0.001$ ; other n-6 PUFAs,  $F_{(2,14)}=0.28$ ,  $p=0.76$ ; n-3 PUFAs,  $F_{(2,14)}=15.08$ ,  $p<0.001$ ; C22:5 n-3,  $F_{(2,14)}=12.04$ ,  $p<0.001$ ; C22:6 n-3,  $F_{(2,14)}=14.86$ ,  $p<0.001$ ; other n-3 PUFAs,  $F_{(2,14)}=0.88$ ,  $p=0.44$ ; other PUFAs,  $F_{(2,14)}=5.70$ ,  $p=0.01$ ; DMA,  $F_{(2,14)}=2.51$ ,  $p=0.12$ ; n-6/n-3 PUFA ratio,  $F_{(2,14)}=86.41$ ,  $p<0.001$ .

At least \* $p<0.05$  vs. all other groups; # $p<0.05$  vs. HF–C.



**Figure 2** Impact of HFD with an unbalanced n-6/n-3 ratio on hippocampus. Representative coronal section showing immunolabeling for doublecortin (Dcx) in the granular zone of the dentate gyrus, scale bar = 100  $\mu$ m (A) and quantification of the number of Dcx-positive cells in the different groups, expressed as the number of cells per mm<sup>2</sup> ( $n=11-12$  per group) (B), image of hippocampal section acquired with a confocal microscope using a 63 $\times$  oil-immersion lens with 3.10 $\times$  zoom, showing immunofluorescent GFAP-positive cells, scale bar: 20  $\mu$ m (C), representative astrocyte isolated with the crop 3D function after being normalized with a Gaussian filter to remove background noise, scale bar: 50  $\mu$ m (D), representation of the same isolated astrocyte reconstructed with the "filament tracer program" (Matlab algorithm) (E), means of morphometric parameters of astrocytes in the hippocampal CA1 region. Values with different subscripts within the same row are significantly different (at least  $p < 0.05$ ) ( $n=5-6$  per group) (F–H) and heat map obtained after performing the gene set analysis included in the BRB-Array Tools package (developed by Richard Simon and the BRB-Array Tools Development Team). Each row represents a single gene ( $n=3$  per group). *Dcx*, doublecortin; *InsR*, insulin receptor; *Atp5j*, ATP synthase; *Syp*, synaptophysin; *Cd200*, cluster of differentiation 200; *Ldhd*, lactate dehydrogenase; *Dnmt1*, DNA methyltransferase; *Slc2a3*, glucose transporter 3; *Syt4*, Synaptotagmin 4 (I) While neurogenesis was unaffected by

to a sharp increase in docosapentaenoic acid (22:5 n-6) ( $p < 0.001$ ), while the decline in n-3 PUFAs was attributable to a decrease in docosahexaenoic acid (22:6 n-3) ( $p < 0.001$  vs. C–C and  $p = 0.003$  vs. HF–C). These changes led to a significantly increased n-6/n-3 PUFAs ratio only in HF–HF rats ( $p < 0.001$ ).

### 3.4.2. Neurogenesis

Perinatal HFD did not have any impact on the total number of immature neurons in the hippocampus of adult rats. Indeed, the number of Dcx-positive cells was similar between C–C and HF–C rats (Fig. 2B). However, adult HF–HF rats exhibited decreased neurogenesis compared to both C–C and HF–C rats ( $p < 0.05$ ).

### 3.4.3. Morphology of astrocytes

A morphometric analysis of astrocytes in the CA3 and DG regions of the hippocampus did not reveal any effect of perinatal or lifelong exposure to HFD (data not shown). However, perinatal HFD was associated with modifications in astrocyte morphology in the CA1 region (Fig. 2F–H). Indeed, HF–C rats had a more numerous and longer astrocytic processes than C–C (both,  $p = 0.02$ ) and HF–HF rats (respectively,  $p = 0.03$  and  $p = 0.07$ ). No difference was observed between C–C and HF–HF rats.

### 3.4.4. Gene expression

Among the 92 genes studied (Supplementary Table S3), the expression of 9 genes was significantly different between groups (at least,  $p < 0.01$ ). The changes in expression of these genes were specific to the hippocampus, as they were not observed in the prefrontal cortex or hypothalamus (data not shown). As shown in Fig. 2I, HF–HF and HF–C rats exhibited a reduction in mRNA levels for doublecortin (*Dcx*), the insulin receptor (*InsR*), cluster of differentiation 200 (*Cd200*) and glucose transporter3 (*Slc2a3*). In addition, the following genes were specifically downregulated in HF–HF compared to HF–C and C–C rats: genes involved in vesicle exocytosis, such as synaptotagmin 4 (*Syt4*) and synaptophysin (*Syp*), in cellular energy processes, such as ATP-synthase-coupling Factor 6 (*Atp5j*) and lactate dehydrogenase (*Ldhd*), and in transcription regulation, such as DNA methyltransferase 1 (*Dnmt1*).

## 3.5. Effects of HFD with an unbalanced n-6/n-3 ratio starting at weaning on spatial memory in adulthood

In order to further clarify the role of perinatal exposure to HFD in the memory deficits observed in HF–HF rats, we examined rats exposed to HFD only from weaning (i.e.

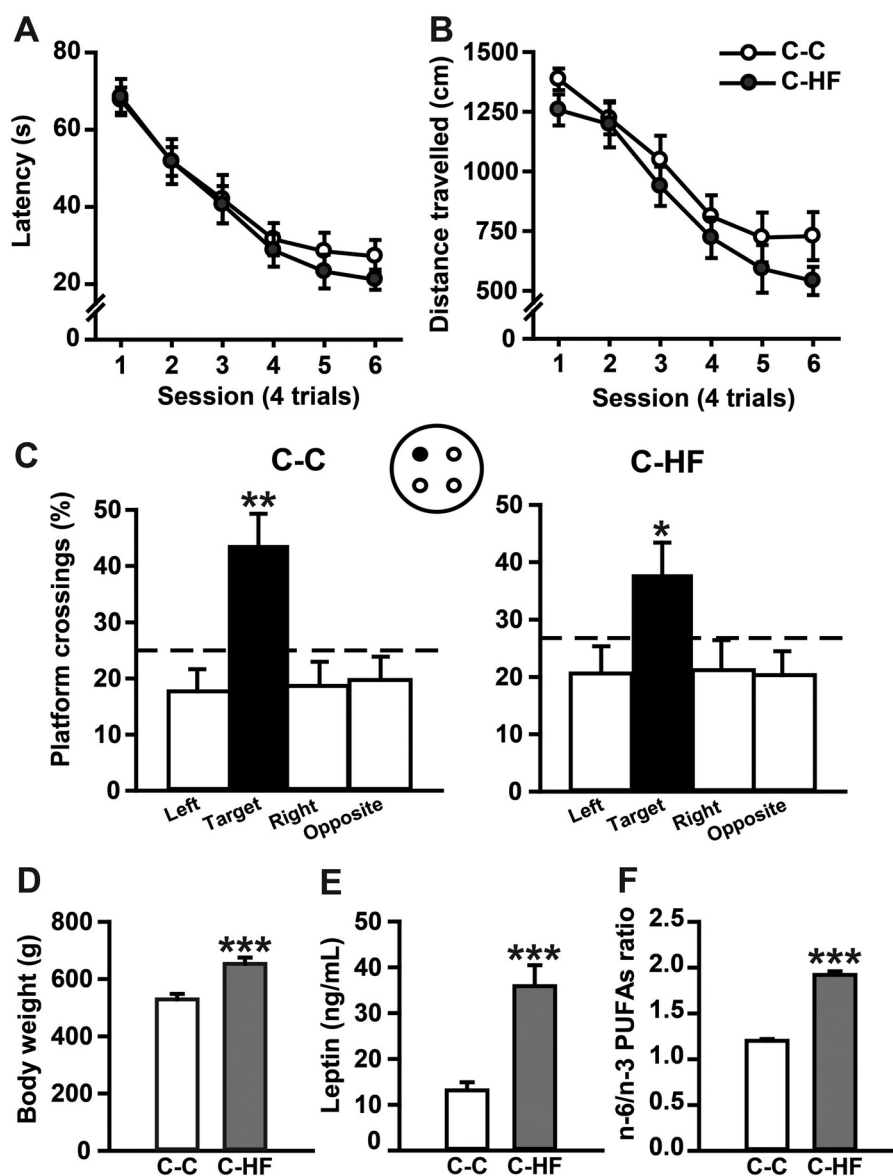
excluding high-fat exposure during the perinatal period) (C–HF). There was no difference between the groups in learning in the water maze task (Fig. 3A and B). Moreover, C–C and C–HF rats crossed the target zone significantly more than expected by chance during the probe test (respectively  $p = 0.004$  and  $p = 0.04$ ) indicating preserved spatial memory performance (Fig. 3C). However, C–HF rats showed higher body weights ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3D), increased plasma leptin levels ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3E) and a higher n-6/n-3 PUFAs ratio in the hippocampus ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3F) compared to C–C rats.

## 4. Discussion

The concept of early nutritional programming highlights the importance of maternal nutrition in the health of offspring (Barker et al., 1993). However, the impact of maternal HFD, independently of maternal obesity, on hippocampal function in adult offspring has not been explored previously, and the studies that have been carried out have only focused on the effects of maternal consumption of HFDs enriched in animal fat. In the present study, we investigated the impact of maternal consumption of HFD from vegetable oils with an unbalanced n-6/n-3 PUFAs ratio on the hippocampal function of adult offspring. The period of exposure was not long enough to lead to overweight in the dams, making it possible to examine the effects of maternal diet per se.

Adult HF–C male offspring exhibited slight metabolic alterations with increased plasma leptin and cholesterol levels, but no change in body weight. We also found that exposure to HFD with an unbalanced n-6/n-3 ratio only during the perinatal period had a long-lasting impact on the hippocampus, leading to changes in astrocyte morphology and a decrease in the expression of genes such as *Dcx*, *InsR*, *Cd200* and *Slc2a3*. Surprisingly, HF–C did not have any impact either on learning capacity or on memory performance in the water maze task after a 48 h retention delay. In contrast, rats exposed to maternal HFD and kept on this diet up to adulthood (HF–HF rats) displayed spatial memory deficits. This observation complements previous findings reporting that the offspring of obese dams' exhibit learning impairments only when they are re-exposed to HFD in adulthood (White et al., 2009). The hippocampus is one of the scarce neurogenic niches in the brain producing new neurons throughout adulthood (Aimone et al., 2014). Even if the exact physiological role of adult neurogenesis in the hippocampus is still matter of debate (Zhao et al., 2008), it is an important process of the hippocampal function that has been proposed to participate to memory (Aimone et al., 2014) and emotion (Sahay and Hen, 2007). In accordance with other studies (Boitard et al., 2012; Lindqvist et al.,

perinatal high-fat diet, lifelong exposure to high-fat diet decreased the number of newborn neurons in the hippocampus ( $F_{(2,32)} = 3.21$ ,  $p = 0.05$ ; Fisher's LSD post hoc,  $p = 0.03$  vs. C–C and HF–C). Perinatal high-fat diet increased the number of astrocytic processes compared to C–C rats ( $F_{(2,14)} = 3.77$ ,  $p = 0.05$ , Fisher's LSD post hoc,  $p = 0.02$ ) and tended to increase it compared to HF–HF rats ( $p = 0.07$ ). In addition, total length of astrocytic processes was increased in HF–C compared to both C–C and HF–HF groups ( $F_{(2,14)} = 4.82$ ,  $p = 0.03$ ; Fisher's LSD post hoc at least  $p < 0.05$  vs. C–C and HF–HF). Among 92 genes tested, the expression of these 9 genes was significantly different between groups (at least  $p < 0.01$ ). HFD either throughout life or restricted to the perinatal period decreased the expression of genes involved in plasticity, cellular metabolism and the regulation of gene expression in the hippocampus. \* $p < 0.05$  and # $p = 0.07$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Figure 3** Impact of HFD with an unbalanced n-6/n-3 ratio starting at weaning on spatial memory in the water maze task (A, B, C) and metabolic profile (D, E) and n-6/n-3 PUFAs ratio in the hippocampus (F). C–HF rats exhibited higher body weight ( $t_{(22)} = 4.26$ ,  $p < 0.001$ ), higher leptin levels ( $t_{(16)} = 5.33$ ,  $p < 0.001$ ) and an increased hippocampal n-6/n-3 PUFA ratio ( $t_{(10)} = 12.80$ ,  $p < 0.001$ ). There was a significant main session effect in escape latency ( $F_{(5,110)} = 37.52$ ,  $p < 0.001$ ) and distance traveled ( $F_{(5,110)} = 27.00$ ,  $p < 0.001$ ) but no difference between groups. C–C and HF–C rats crossed the target zone a significantly greater number of times than would be expected by chance alone (C–C,  $t_{(12)} = 5.36$ ,  $p = 0.004$  and C–HF,  $t_{(10)} = 5.53$ ,  $p = 0.04$ ). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ .

2006; Park et al., 2010), we found that rats fed HFD throughout life displayed a decreased number of newborn neurons in the hippocampus in adulthood. These alterations could participate to the detrimental effects of HFD on spatial memory. Here, we also found that HF–C rats had more and longer astrocytic processes in the CA1 area. However, whether this change was a long-term effect of perinatal high-fat exposure or a consequence of the switch to a control diet with a balanced n-6/n-3 ratio remains to be determined. Accumulating evidence suggests that interactions between astrocytes and neurons regulate synaptic activity (Perea et al., 2009) and could play an important role in memory processes (Ben Achour and Pascual, 2012). Interestingly,

previous work demonstrates that dietary supplementation with n-3 PUFAs reverses morphological changes in astrocytes induced by aging and restores memory performance (Labrousse et al., 2012). Thus, the extension of astrocytic processes may prevent memory dysfunctions in HF–C rats.

Rats fed HFD with an unbalanced n-6/n-3 ratio from the first day of gestation to adulthood presented a higher n-6/n-3 PUFAs ratio in the hippocampus than controls. n-6 and n-3 PUFAs are essential components of membrane phospholipids, and their accretion is particularly high during the perinatal period (Bazinet and Layé, 2014). Changes in membrane fatty acid composition can modify membrane fluidity and thus influence cell signaling (Bazinet and Layé, 2014).

Using the TLDA technique, we observed several changes in markers involved in either neurotransmitter release or neuronal function. Both perinatal HFD alone and HFD exposure from conception to adulthood affected *Dcx*, *InsR*, *Cd200* and *Slc2a3* genes expression. Some of these genes are downregulated in the hippocampus of aged animals or in animal models of Alzheimer disease (Ben Abdallah et al., 2010; Pedros et al., 2014). However, despite alterations in several key markers of neuronal function in the hippocampus, HFD restricted to the perinatal period does not seem to affect spatial memory in male adult offspring. However, we cannot exclude that HF–C animals were impaired in others memory tasks, or after a more challenging retention delay (such as 96 h instead of 48 h) in the water maze. It would also be of interest to examine spatial memory performance at different points during the lifespan in this group, as they could exhibit greater vulnerability to memory deficits during aging. Life-long exposure to HFD specifically altered the expression of some genes, such as that of DNA methyltransferase 1 (*Dnmt1*), implicated in gene repression. It has been demonstrated that the DNMTs play an important role in synaptic function (Feng et al., 2010). Moreover, we observed that perinatal HFD continued into adulthood decreased the expression of synaptotagmin 4 and synaptophysin, two major molecules involved in vesicle exocytosis. Both synaptic vesicle proteins, which modulate synaptic transmission, have been suggested to play a crucial role in learning and memory processes (Ferguson et al., 2000; Frick and Fernandez, 2003). Recent finding demonstrated that chronic n-3 PUFAS supplementation is associated with elevated synaptophysin expression and increased cell proliferation in the hippocampus (Venna et al., 2009). However, despite a downregulation of doublecortin gene expression, immunohistochemistry analysis did not reveal any significant effect of perinatal HFD on neurogenesis. Further studies should be performed in order to determine the respective role of unbalanced n-6/n-3 ratio and high-fat intake in the hippocampal alterations observed in HF–HF rats.

In addition, life-long exposure to HFD induced an increase in body weight and changes in plasma metabolic markers, including higher plasma levels of leptin. Metabolic alterations could partly be responsible for the cognitive impairments observed in HFD-fed animals (Greenwood and Winocur, 2005; Stranahan et al., 2008). Here we did not report alteration of glucose or insulin plasma levels in fasted animals as reported by some studies with HFD (Buettner et al., 2012). The lack of additional sucrose (7% in both diets) or cholesterol in our HFD could contribute to this effect. While exposure to maternal HFD alone did not have any impact on body weight in adulthood, it led to higher plasma leptin levels compared to control rats, as well as to plasma cholesterol levels similar to those in HF–HF rats. Thus, the memory deficits observed in HF–HF rats do not seem to be strictly related to metabolic dysfunctions. In order to better delineate the role of maternal exposure to HFD, we conducted an additional study in which HFD exposure started at weaning (i.e. excluding the perinatal period). Rats fed HFD only after weaning exhibited an increased hippocampal n-6/n-3 PUFAS ratio, and were overweight. Surprisingly they did not show any memory impairments in the water maze. Previous studies examining the impact of HFD in

mature rats report learning and memory impairments in spatial tasks (for review see Kanoski and Davidson, 2011). This discrepancy could be explained by the differences between the HFD diets used. Here, animals were exposed to a moderate fat diet with 39% from fat, rather than a HFD with more than 55% from fat (Murray et al., 2009; Pathan et al., 2008) or a HFD combined with simple carbohydrates as in several studies (Boitard et al., 2012, 2014; Goldbart et al., 2006; Molteni et al., 2002; Stranahan et al., 2008). Finally, in most studies, the source of fat is usually lard and contains cholesterol, which has detrimental effects on cognition (Granhölm et al., 2008). Since C–HF were not impaired in the water maze, our results could suggest that the memory deficits observed in HF–HF rats are due to the combination of perinatal and adult exposure to HFD, and that perinatal exposure alone is necessary but not sufficient to induce memory deficits. We speculated that the switch to a control diet low in saturated fatty acids with an adequate n-6/n-3 PUFAS ratio at weaning could in part underlie the restoration of the hippocampal function in the HF–C group.

In conclusion, we have shown here that independent of maternal obesity, perinatal exposure to HFD with an unbalanced n-6/n-3 ratio affects genes expression and astrocyte morphology in the hippocampus and can sensitize the brain to alterations of hippocampus-dependent memory when this HFD is maintained throughout life. These data provide evidence that early nutrition can have long-lasting effects on the hippocampus, especially when combined with unhealthy eating habits later in life.

## Role of the funding sources

This study was supported by INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) (Action Prioritaire Dpt AlimH “Early nutritional imprinting: effects of western-diet on brain development and prevention by n-3 PUFAs”), M.D. was supported by the University of Bordeaux 2 (BQR Bonus Qualité Recherche, Aide à l’installation nouvelle équipe), T.L. was the recipient of a postdoctoral fellowship from the Société Française de Nutrition (SFN), A.L. was supported by a stipend from the Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## Conflict of interest

None declared.

## Acknowledgments

We are grateful to Marie Basquin for her help with immunohistochemistry, Isabelle Grit for hormone assays and to Fabien Alcaraz for his help with the behavioral study. We also thank Raymond Bergès, Laurence Decocq, Patrick Tassin, Bruno Pasquis and Phillipe Birac for animal care. This work was supported by the AlimH Department of the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Bordeaux University.



## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.12.008>.

## References

- Abildgaard, A., Solskov, L., Volke, V., Harvey, B.H., Lund, S., Wegener, G., 2011. A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the flinders sensitive line (FSL) rat, a genetic model of depression. *Psychoneuroendocrinology* 36, 623–633.
- Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W., Gage, F.H., 2014. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol. Rev.* 94, 991–1026.
- Barker, D.J., Gluckman, P.D., Godfrey, K.M., Harding, J.E., Owens, J.A., Robinson, J.S., 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341, 938–941.
- Bazinet, R.P., Layé, S., 2014. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 771–785.
- Ben Abdallah, N.M., Slomianka, L., Vyssotski, A.L., Lipp, H.P., 2010. Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiol. Aging* 31, 151–161.
- Ben Achour, S., Pascual, O., 2012. Astrocyte-neuron communication: functional consequences. *Neurochem. Res.* 37, 2464–2473.
- Bernard, J.Y., De Agostini, M., Forhan, A., de Lauzon-Guillain, B., Charles, M.A., Heude, B., 2013. The dietary n6:n3 fatty acid ratio during pregnancy is inversely associated with child neurodevelopment in the EDEN mother–child cohort. *J. Nutr.* 143, 1481–1488.
- Bilbo, S.D., Tsang, V., 2010. Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. *FASEB J.* 24, 2104–2115.
- Blasbalg, T.L., Hibbeln, J.R., Ramsden, C.E., Majchrzak, S.F., Rawlings, R.R., 2011. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am. J. Clin. Nutr.* 93, 950–962.
- Boitard, C., Etchamendy, N., Sauviant, J., Aubert, A., Tronel, S., Marighetto, A., Laye, S., Ferreira, G., 2012. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 22, 2095–2100.
- Boitard, C., Cavaroc, A., Sauviant, J., Aubert, A., Castanon, N., Laye, S., Ferreira, G., 2014. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav. Immun.* 40, 9–17.
- Buettner, R., Schölmerich, J., Bollheimer, L.C., 2012. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 15, 798–808.
- Camargo, N., Brouwers, J.F., Loos, M., Gutmann, D.H., Smit, A.B., Verheijen, M.H., 2012. High-fat diet ameliorates neurological deficits caused by defective astrocyte lipid metabolism. *FASEB J.* 26, 4302–4315.
- Cameron, H.A., Glover, L.R., 2015. Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annu. Rev. Psychol.* 66, 32.1–32.29.
- Cano, V., Valladolid-Acebes, I., Hernandez-Nuno, F., Merino, B., Del Olmo, N., Chowen, J.A., Ruiz-Gayo, M., 2015. Morphological changes in glial fibrillary acidic protein immunopositive astrocytes in the hippocampus of dietary-induced obese mice. *Neuroreport* 26, 819–822.
- Cordain, L., Eaton, S.B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B.A., O'Keefe, J.H., Brand-Miller, J., 2005. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 341–354.
- Coupe, B., Amarger, V., Grit, I., Benani, A., Parnet, P., 2010. Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology* 151, 702–713.
- Darnaudey, M., Perez-Martin, M., Del Favero, F., Gomez-Roldan, C., Garcia-Segura, L.M., Maccari, S., 2007. Early motherhood in rats is associated with a modification of hippocampal function. *Psychoneuroendocrinology* 32, 803–812.
- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S.L., Le, T., Li, E., Sweatt, J.D., Silva, A.J., Fan, G., 2010. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat. Neurosci.* 13, 423–430.
- Ferguson, G.D., Anagnostaras, S.G., Silva, A.J., Herschman, H.R., 2000. Deficits in memory and motor performance in synaptotagmin IV mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5598–5603.
- Frick, K.M., Fernandez, S.M., 2003. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol. Aging* 24, 615–626.
- Goldbart, A.D., Row, B.W., Kheirandish-Goza, L., Cheng, Y., Brittan, K.R., Goza, D., 2006. High fat/refined carbohydrate diet enhances the susceptibility to spatial learning deficits in rats exposed to intermittent hypoxia. *Brain Res.* 1090, 190–196.
- Granhall, A.C., Bimonte-Nelson, H.A., Moore, A.B., Nelson, M.E., Freeman, L.R., Sambamurti, K., 2008. Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. *J. Alzheimers Dis.* 14, 133–145.
- Greenwood, C.E., Winocur, G., 2005. High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. *Neurobiol. Aging* 26 (Suppl. 1), 42–45.
- Harbeby, E., Jouin, M., Alessandri, J.M., Lallemand, M.S., Linard, A., Lavielle, M., Huertas, A., Cunnane, S.C., Guesnet, P., 2012. n-3 PUFA status affects expression of genes involved in neuroenergetics differently in the fronto-parietal cortex compared to the CA1 area of the hippocampus: effect of rest and neuronal activation in the rat. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 86, 211–220.
- Kanoski, S.E., Davidson, T.L., 2011. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol. Behav.* 103, 59–68.
- Labrousse, V.F., Nadjar, A., Joffre, C., Costes, L., Aubert, A., Gregoire, S., Bretillon, L., Laye, S., 2012. Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS ONE* 7, e36861.
- Lindqvist, A., Mohapel, P., Bouter, B., Frielingsdorf, H., Pizzo, D., Brundin, P., Erlanson-Albertsson, C., 2006. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur. J. Neurol.* 13, 1385–1388.
- Minni, A.M., de Medeiros, G.F., Helbling, J.C., Duittoz, A., Marissal-Arvy, N., Foury, A., De Smedt-Peyrusse, V., Pallet, V., Moisan, M.P., 2014. Role of corticosteroid binding globulin in emotional reactivity sex differences in mice. *Psychoneuroendocrinology* 50, 252–263.
- Molteni, R., Barnard, R.J., Ying, Z., Roberts, C.K., Gómez-Pinilla, F., 2002. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* 112, 803–814.
- Murray, A.J., Knight, N.S., Cochlin, L.E., McAleese, S., Deacon, R.M., Rawlins, J.N., Clarke, K., 2009. Deterioration of physical performance and cognitive function in rats with short-term high-fat feeding. *FASEB J.* 23, 4353–4360.
- Niculescu, M.D., Lupu, D.S., 2009. High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 627–633.
- Page, K.C., Jones, E.K., Anday, E.K., 2014. Maternal and post-weaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 306, R527–R537.
- Park, H.R., Park, M., Choi, J., Park, K.Y., Chung, H.Y., Lee, J., 2010. A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid

- peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci. Lett.* 482, 235–239.
- Pathan, A.R., Gaikwad, A.B., Viswanad, B., Ramarao, P., 2008. Rosiglitazone attenuates the cognitive deficits induced by high fat diet feeding in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 589, 176–179.
- Paxinos, G., Watson, C., 1982. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Pedros, I., Petrov, D., Allgaier, M., Sureda, F., Barroso, E., Beas-Zarate, C., Auladell, C., Pallas, M., Vazquez-Carrera, M., Casadesus, G., Folch, J., Camins, A., 2014. Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1556–1566.
- Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32, 421–431.
- Remondes, M., Schuman, E.M., 2004. Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory. *Nature* 431, 699–703.
- Sahay, A., Hen, R., 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat. Neurosci.* 10, 1110–1115.
- Simon, R., Lam, A., Li, M.C., Ngan, M., Menenzes, S., Zhao, Y., 2007. Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. *Cancer Inf.* 3, 11–17.
- Simopoulos, A.P., 2011. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol. Neurobiol.* 44, 203–215.
- Stranahan, A.M., Norman, E.D., Lee, K., Cutler, R.G., Telljohann, R.S., Egan, J.M., Mattson, M.P., 2008. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 18, 1085–1088.
- Tozuka, Y., Kumon, M., Wada, E., Onodera, M., Mochizuki, H., Wada, K., 2010. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochem. Int.* 57, 235–247.
- Tozuka, Y., Wada, E., Wada, K., 2009. Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. *FASEB J.* 23, 1920–1934.
- Venna, V.R., Deplanque, D., Allet, C., Belarbi, K., Hamdane, M., Bordet, R., 2009. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* 34, 199–211.
- White, C.L., Pistell, P.J., Purpera, M.N., Gupta, S., Fernandez-Kim, S.O., Hise, T.L., Keller, J.N., Ingram, D.K., Morrison, C.D., Bruce-Keller, A.J., 2009. Effects of high fat diet on Morris maze performance, oxidative stress, and inflammation in rats: contributions of maternal diet. *Neurobiol. Dis.* 35, 3–13.
- Zhao, C., Deng, W., Gage, F.H., 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645–660.

## ***Partie II :***

### ***Impact du régime maternel hyperlipidique combiné au stress précoce sur la réponse métabolique à des challenges nutritionnels et la motivation alimentaire à l'âge adulte***

#### **Objectifs**

Les données épidémiologiques montrent qu'une histoire d'adversité dans l'enfance prédispose à l'obésité à l'âge adulte et peut aussi conduire à développer des comportements alimentaires de type « addictifs ». L'environnement nutritionnel actuel de nos sociétés subit de profonds changements avec une augmentation de la consommation d'aliments riches en lipides et ceci également chez les femmes enceintes et les jeunes enfants. L'étude des effets combinés de plusieurs facteurs périnataux reste difficile à étudier chez l'homme.

**Le but de cette étude était d'examiner l'impact d'un stress précoce combiné à un régime maternel hyperlipidique sur le comportement alimentaire et la vulnérabilité métabolique à des challenges nutritionnels chez la descendance.**

#### **Matériel et méthodes**

Des femelles Wistar ont été nourries avec un régime standard (12% de lipides, 3,9kcal/g) ou un régime hyperlipidique (39% de lipides, 4,9kcal/g) pendant la gestation et la lactation. Entre le 2<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour postnatal, les ratons ont été séparés de leur mère, 3h par jour. La sensibilité à des challenges nutritionnels en fonction de l'histoire précoce a été étudiée sur la descendance mâle. A l'âge de 35 jours, les animaux ont été exposés à un régime hyperlipidique (45% de lipides, 7% de sucrose, 4,9kcal/g), afin d'étudier l'impact de l'histoire précoce sur les modifications métaboliques (poids, accumulation de tissus adipeux, hormones métaboliques) associées à un environnement obésogène. Pendant les premières 5 semaines d'exposition au régime hyperlipidique, ce



régime était proposé en libre choix avec un régime standard de laboratoire. Les animaux ont ensuite été nourris exclusivement avec le régime hyperlipidique durant 3 semaines. Sur un autre groupe d'animaux nourri avec un régime standard de laboratoire (10% de lipides, 2,9kcal/g), nous avons étudié les variations de poids après une privation alimentaire suivie d'un période de ré-alimentation, et la motivation alimentaire.

La motivation pour de la nourriture a été examinée, à l'adolescence, en utilisant le paradigme de l'allée droite et à l'âge adulte grâce au conditionnement opérant en cage en Skinner. Chez des rats âgés de 55 jours, nous avons mesuré la latence pour atteindre une récompense située au bout d'une allée droite, comme un indice de motivation alimentaire. Nous avons examiné la motivation dans des conditions physiologiques différentes (restriction alimentaire *vs. ad libitum*) et pour des récompenses ayant différentes valeur de récompense (nourriture standard *vs. palatable*). Pour le conditionnement opérant, nous avons entraîné les rats à appuyer sur un lever afin d'obtenir une pastille de nourriture. Après cette phase d'apprentissage, nous avons évalué la motivation de ces rats en utilisant une tâche de ratio progressif 3, dans lequel le rat doit faire, à chaque fois, 3 appuis en plus pour obtenir la récompense (1 appui pour une pastille, puis 4 appuis, puis 7, 10, etc.). Cette tâche permet de mesurer les efforts que l'animal est prêt à fournir pour obtenir la récompense. Ainsi, l'indice de motivation est représenté par le dernier nombre d'appuis successifs pour obtenir une pastille (« breakpoint »). Nous avons effectué cette tâche chez des rats en restriction alimentaire ou nourris *ad libitum*, et en utilisant 2 types de pastilles, des pastilles « standard » et des pastilles palatables riches en sucres et en lipides.

## Résultats

Un tableau regroupant les résultats de cette étude est présenté ci-dessous.

**Tableau 5 : Bilan des effets de la séparation maternelle et du régime maternel hyperlipidique (HL) sur le phénotype métabolique et la motivation alimentaire des descendants à l'âge adulte obtenus dans la partie I.**

	Paramètres	Séparation maternelle	Régime maternel HL	Séparation maternelle + régime maternel HL
	<b>Poids au sevrage</b>	-	↘	↘
	<b>Poids à J35</b>	-	↗	↗
Paramètres métaboliques	<b>Poids à l'âge adulte</b>	-	-	-
	<b>Tissus adipeux</b>	↗	-	↗
	<b>Leptine, insuline</b>	-	-	-
	<b>Cholestérol</b>	-	↗	↗
	<b>TG</b>	-	↗	↗
	<b>Glucose</b>	-	↗	↗
	<b>Tolérance au glucose</b>	-	↘	↘
Réponse au challenge privation-réalimentation	<b>Perte de poids après 24h de jeûn</b>	↗	-	↗
	<b>Reprise de poids après réalimentation</b>	↗	-	↗
	<b>Prise alimentaire pendant la réalimentation</b>	-	-	-
Réponse à un régime obésogène	<b>Prise de poids</b>	↗	-	↗
	<b>Tissus adipeux</b>	↗	-	↗
	<b>Insuline</b>	↗	↗	-
	<b>Leptine, cholestérol, TG</b>	-	-	-
Motivation alimentaire	<b>A L'ADOLESCENCE</b> <i>en restriction alimentaire (pour du standard)</i>	↗	-	↗
	<i>sans restriction alimentaire (palatable)</i>	↗	↗	↗
	<b>A L'AGE ADULTE</b> <i>En restriction alimentaire (palatable)</i>	-	-	-
	<i>Sans restriction alimentaire (palatable)</i>	↗	-	↗

« ↗ » et « ↘ » correspondant respectivement à une augmentation et une diminution du paramètre donné par rapport au groupe témoin sous régime maternel standard et élevé en condition standard de laboratoire. « - » indiquant une absence d'effet.

## Discussion

Globalement nos résultats indiquent l'environnement précoce de stress ou hyperlipidique a des effets à long terme sur le métabolisme et la motivation alimentaire. Pour la plupart des paramètres étudiés, nous n'avons pas observé d'effets additionnels des 2 manipulations précoces. De plus les effets respectifs diffèrent, avec majoritairement des effets métaboliques pour le régime périnatal hyperlipidique et des effets comportementaux pour le stress précoce.

Le stress précoce n'a pas d'effet significatif sur le poids des rats nourris avec un régime standard, mais potentialise la prise de poids et favorise le dépôt de tissus adipeux, sous régime palatable hyperlipidique. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que les rats exposés au stress précoce présentent une augmentation de la motivation alimentaire à l'adolescence et à l'âge adulte. Cette augmentation de la motivation alimentaire est, en partie, liée à la palatabilité de la récompense. En effet, à l'âge adulte, il n'y a aucun effet du stress précoce sur la motivation quand la récompense n'est pas palatable (*i.e* pastilles standard). Il semble donc que les rats ayant subi un stress précoce soient plus sensibles aux propriétés hédoniques de la nourriture. De manière intéressante, nous n'avons observé aucun impact du stress précoce sur la consommation de régime hyperlipidique dans la cage d'élevage au cours des 5 semaines d'exposition au régime hyperlipidique en condition de choix. Au regard de ces résultats, il semble que le stress précoce n'affecte pas la perception de la palatabilité des aliments, correspondant à la composante du « liking », mais altère la composante du « wanting » des processus motivationnels (Barbano et Cador, 2006; Berridge et al., 2009).

De plus, les rats exposés au stress précoce perdent plus de poids après une privation alimentaire et en reprennent plus pendant la période de réalimentation. Cette augmentation du poids n'est pas associée à une prise alimentaire plus importante, suggérant ainsi que les rats exposés au stress précoce présentent des perturbations dans la régulation de la balance énergétique. L'étude des hormones métaboliques n'a pas permis d'isoler un acteur potentiel pouvant expliquer cette prise de poids plus importante chez les rats exposés au stress précoce. En effet, nous n'avons pas observé

aucun impact du stress précoce sur les taux plasmatiques de leptine, de triglycérides ou de cholestérol. En revanche, le stress précoce augmente les taux d'insuline, pouvant suggérer une insulino-résistance. Bien qu'il existe des liens entre l'insulino-résistance et l'accumulation de tissus adipeux (Frayn, 2001), celle-ci ne peut, à elle seule, expliquer l'augmentation de tissus adipeux chez les rats exposés à la séparation maternelle. En effet, les descendants stressés précocement issus de mères sous régime hyperlipidique, bien qu'ils aient une augmentation du tissu adipeux, ne présentent aucune modification des taux d'insuline. Des études complémentaires seraient nécessaires pour déterminer les processus sous-tendant cette vulnérabilité métabolique des rats exposés au stress précoce. Parmi les processus possibles, l'accumulation de tissus adipeux pourrait, par exemple, s'expliquer par des altérations du métabolisme mitochondrial dans le tissu adipeux (Miki et al., 2013).

En conclusion, nous proposons que les perturbations de régulation du poids combinée à l'augmentation de la motivation pour des aliments palatables participent à la potentialisation de la prise de poids sous régime palatable hyperlipidique.

Dans notre étude, l'exposition au régime hyperlipidique pendant la gestation et la lactation n'entraîne pas de surpoids chez la mère.

Bien que l'exposition à un régime maternel hyperlipidique n'ait eu aucune incidence sur le poids, nous avons observé que les descendants adultes de mères sous régime hyperlipidique pendant la gestation et la lactation présentent une hypercholestérolémie, une hyperglycémie et une intolérance au glucose par rapport à des descendants de mères sous régime standard. De manière intéressante, ces altérations métaboliques ne sont plus visibles quand les animaux sont nourris avec un régime hyperlipidique à l'âge adulte. Certains travaux réalisés, chez la souris, montrent que le régime maternel hyperlipidique peut potentialiser les altérations induites par une exposition à un régime hyperlipidique en post sevrage (Kruse et al., 2013; Volpato et al., 2012). Cependant, une autre étude montre que les descendants de mères sous régime hyperlipidique peuvent, au contraire, être protégés de la prise de poids sous régime obésogène à l'âge adulte (Couvreur et al., 2011). Les différences de résultats peuvent s'expliquer par des différences dans les effets engendrés par l'exposition au régime hyperlipidique chez la mère. En effet, la durée d'exposition ainsi que les types de régimes peuvent conduire à

des altérations métaboliques seules ou à des altérations métaboliques associées à une obésité chez la mère, qui pourraient participer aux effets métaboliques à long terme sur la descendance (Shankar et al., 2008; White et al., 2009b).

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que le régime maternel hyperlipidique augmente la motivation pour de la nourriture palatable chez le rat adolescent. Cependant, cet effet est spécifique de l'adolescence, puisque, à l'âge adulte, cette augmentation de la motivation n'est plus observée. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que l'adolescence représente une période plus grande sensibilité aux stimulus récompensant (Gladwin et al., 2011).

En conclusion, le régime maternel entraîne une augmentation des processus motivationnels qui ne sont mis en évidence qu'au cours de périodes de vulnérabilité comme l'adolescence. De plus, le régime maternel hyperlipidique, indépendamment de l'obésité maternelle, semble pouvoir programmer des altérations métaboliques à long terme chez la descendance, particulièrement dans un environnement nutritionnel qui tranche avec l'environnement nutritionnel précoce.

## **Conclusion**

Ce travail a permis de mettre en évidence que le stress et/ou l'exposition à un régime hyperlipidique pendant la période périnatale des effets à long terme sur le profil métabolique et la motivation alimentaire. Le régime maternel hyperlipidique sans obésité maternelle, a des effets sur le profil métabolique de la descendance. Par ailleurs, le régime périnatal hyperlipidique combiné au stress précoce vulnérabilisent à la prise de poids associée à la consommation d'un régime hyperlipidique palatable. De façon remarquable, le stress précoce, *per se*, augmente le tissu adipeux, entraîne une plus grande sensibilité aux variations pondérales induites par une privation alimentaire aigue et exacerbe la motivation alimentaire.

# IMPACT OF A PERINATAL HIGH-FAT DIET COMBINED TO A MATERNAL SEPARATION ON RESPONSE TO NUTRITIONAL CHALLENGES AND FOOD MOTIVATION IN OFFSPRING

*en cours de soumission à Frontiers in Behavioural Neurosciences*

**Amandine L. Lépinay**<sup>1,2</sup>, Lucille Alonso<sup>1,2</sup>, Agnès Aubert<sup>1,2</sup>, Stéphanie Caillé-Garnier<sup>3,4</sup>, Martine Cador<sup>3,4</sup>, Sophie Layé<sup>1,2</sup>, Muriel Darnaudéry<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup> INRA, Nutrition et Neurobiologie Intégrée, UMR1286, 33000 Bordeaux, France

<sup>2</sup> Université de Bordeaux, Nutrition et Neurobiologie Intégrée, UMR1286, 33000 Bordeaux, France

<sup>3</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, UMR5287 INCIA, 33076 Bordeaux, France

<sup>4</sup> Université de Bordeaux, INCIA, BP31, 33076 Bordeaux, France

## **Corresponding author:**

Pr Muriel Darnaudéry

INRA, Nutrition and Integrative Neurobiology (NutrINeurO),

University of Bordeaux, UMR1286,

146 Rue Léo Saignat,

F-33000 Bordeaux, France.

**Email:** muriel.darnaudery@u-bordeaux.fr

**Running title:** Metabolic programming by early stress and maternal high-fat diet

**Abbreviation:** PND, Postnatal Day; HPA, Hypothalamo-Pituitary Adrenal; iGTT, Intraperitoneal Glucose Tolerance Test; SD, Standard Diet; HFD, High-Fat Diet.

## ABSTRACT

Environmental factors during the perinatal period can have long lasting effects on later health. For instance, nutritional environment and affective environment during childhood have been proposed to play a critical role in the development of obesity and metabolic disorders in adulthood. Animal studies have shown that early stress as well as maternal high-fat diet exposure induce changes in feeding behavior and lead to metabolic alterations in adulthood. However, the exact contribution of each factor and the effect of their combination have not yet been addressed. In this study, dams were fed either a standard diet (12% kcal fat) or a high-fat diet (39% kcal fat) throughout gestation and lactation. Between postnatal day (PND) 2 and PND14, early stressed offspring underwent chronic maternal separation (3h/day). We studied the vulnerability to metabolic changes after nutritional challenges and food-motivated behaviors in adults depending on the early history of stress or/and maternal high-fat diet. We showed that early stressed offspring lost significantly more weight after food deprivation and gained more weight after a period of refeeding. When fed a high-fat diet, early stressed rats exhibited enhanced body weight gain. In addition, they displayed higher motivated-behavior for food in both late adolescence and adulthood. Offspring born to dams fed a high-fat diet showed enhanced motivation for palatable food during late adolescence and higher levels of cholesterol, triglycerides and glucose in adulthood. Altogether, our results demonstrated that maternal high-fat diet has long term effects on offspring metabolism and that experiencing stress during early life induces long lasting effects on motivated-behavior for food and increases the vulnerability to metabolic dysfunctions when exposed to obesogenic diet in adulthood.

**Keywords:** early life stress, perinatal programming, feeding behavior, metabolism,

## INTRODUCTION

Over the past decades, obesity has become a worldwide health challenge (Nguyen et al., 2010). Modern society are characterized by an easy access to palatable and calorie-dense foods, which could partially contribute to the increasing prevalence of obesity (Egecioglu et al., 2011; Avena, 2011). Even if genetic factors play a major role, many studies emphasize the critical role of environmental factors during early life in the interindividual difference in weight gain in adulthood (Spencer, 2013; Taylor and Poston, 2007; Levin, 2006).

The metabolic status of the mother (gestational diabete/obesity) as well as her nutritional status during pregnancy and lactation have been widely characterized as important determinants of the onset of metabolic dysfunctions and obesity in adulthood (McMillen and Robinson, 2005; Plagemann et al., 1997; Whitaker, 2004). Recent studies suggest a higher prevalence of metabolic dysfunctions and obesity as well as risks of food addiction in adulthood in subjects exposed to childhood adversity, such as parental neglect or sexual abuse (D'Argenio et al., 2009; Gunstad et al., 2006; Mason et al., 2013). Despite a marked change of the dietary habits in the modern societies, the impact of perinatal fat exposure combined with early adversity is currently unknown. However, parental stress during childhood is often associated with unhealthy eating habits (Parks et al., 2012). Experimental data on the impact of early life stress on metabolic and feeding behavior are limited. In rodents, it has been demonstrated that female exposed to maternal separation are more prone to eat high carbohydrates palatable foods (McIntosh et al., 1999). Maternal separation has also been associated with hyperphagia, as well as exaggerated body weight variations in response to repeated cycles of fasting and refeeding (Ryu et al., 2008). More recently, it has been shown that maternal separation enhances the insulin rise induced by exposure to an obesogenic diet in adulthood in female rats (Paternain et al., 2012). Moreover, n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) deficiency worsens the metabolic alterations induced by early stress in rats, suggesting that early stress may interact with nutritional factors (Bernardi et al., 2013). However, the impact of high-fat diet during the perinatal period combined with early on metabolic profile and feeding behavior has not been explored.

Animal models have demonstrated that maternal high-fat diet modifies offspring metabolism and feeding behavior in adulthood. Indeed, offspring born to dams fed a high-fat diet exhibit increased body weight and visceral adipose tissue in adulthood (Howie et al., 2009; Kirk et al., 2009; Volpato et al., 2012). It has also been shown that early exposure to high-fat diet increases food intake (Kirk et al., 2009; Walker et al., 2008) and enhances the preference



(Bayol et al., 2007; Bayol et al., 2005; Carlin et al., 2013a; Ong and Muhlhausler, 2011; Vucetic and Reyes, 2010) or the motivation for palatable food later in life (Naef et al., 2011).

However, these studies do not dissociate the respective role of maternal obesity and maternal high-fat diet *per se*, and use high-fat diets containing lipids from animal sources. However, over the past decades, the consumption of fat from animal sources has decreased while there is an increasing consumption of oils rich in saturated fatty acids and n-6 PUFAs (Blasbalg et al., 2011). These dietary patterns have led to an unbalanced n-6/n-3PUFAs intake (Patterson et al., 2012). The impact of these nutritional changes on metabolic profile and feeding behavior in offspring remains poorly explored.

The present study was designed to examine the impact of maternal separation and/or exposure to maternal western diet during the perinatal period on metabolic vulnerability and food-motivated behavior in adulthood. First, we studied the impact of these early manipulations on body weight regulation after a cycle of fasting and refeeding and in response to a palatable high-fat diet exposure in adulthood. Second, we evaluated motivation for food, especially palatable food in adolescent male rats and in adults.

## METHODS

All the experiments were conducted according to the French (Directive 87/148, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche) and European Directive (2010/63/EU, 2010 September 22<sup>th</sup>) legislations. The procedures followed in the study were approved, by Région Aquitaine Veterinary Services (Direction Départementale de la Protection des Animaux, approval ID: A33-063-920). Every effort was made to minimize suffering and the number of animals used. Animals were maintained in a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 08:00 h) in a temperature-controlled room (22°C) with free access to water and *ad libitum* access to food except during motivation assessments. All behavioral assessments were conducted during the light-phase.

**Breeding.** Fifty six nulliparous female Wistar and twenty eight male Wistar rats (11weeks old) were purchased from Janvier (Le Genest, Saint-Isle, France). After ten days of habituation, two female were placed into a male's cage for one week for breeding. Then, pregnant dams were single housed throughout gestation and lactation. The day of delivery was designated postnatal day (PND) 0. At PND 1, litters were weighted and culled to 10-12

pups, with an equal sex distribution. Litters with a number of pups below 6 or above 16 were excluded from the study.

**Maternal diets.** Female rats were weight-matched and assigned to standard diet (SD) or high-fat diet (HFD). The high-fat diet (4.7kcal/g, 39% of energy from fat, 46% of carbohydrates, 15% of proteins) was modeled after the western diet, with an important part of lipids coming from vegetal sources (mainly from palm oil) with the n-6/n-3 PUFA ratio of 39. The standard diet (3.9 kcal/g, 12% of energy from fat, 70 % of energy from carbohydrates, 18% of energy from proteins) contained the recommended ratio of 5. The diets were prepared by INRA (UPAE, Jouy en Josas, France). Diet exposure started at mating and was maintained until pups' weaning at PND21.

**Early stress procedure.** From PND2 and PND14, early stressed pups were daily separated from the dams for 180min. They were individually placed into plastic cups in an adjacent room kept at 32°C ±2. Control pups were left undisturbed until PND21.

### **Experiment 1: Impact of early stress and maternal high-fat diet on behavioral and metabolic responses to nutritional challenges**

**Post weaning diets.** At PND36, male offspring was placed on either laboratory chow diet (Safe, France) (n=40) or a palatable high-fat (24% of fat, 24% of proteins and 46% of carbohydrate with 20% from sucrose, D12451, Research diet, Brogaarden, Denmark) (n=39) for a duration of 8weeks. In order to mimic human eating patterns, rats were given a free choice of a high-fat diet and a standard chow in the home cage. To control the impact of interindividual differences fat preference on body weight growth, rats were then switched to no-choice high-fat diet for the last 3weeks of exposure. Body weight and food intake were weekly monitored during all the experiment.

**Body weight changes and food intake after fasting-refeeding.** At PND50, rats fed a chow diet were fasted for 18 hours and then re-fed by 24 hour. Body weight changes after the starvation and refeeding periods were calculated. Food intake was measured one, two, three

and 24 hours post refeeding. Food efficiency was estimated as the ratio of weight gain to the amount of energy consumed during the 24hr-refeeding period.

**Intraperitoneal Glucose Tolerance Test (iGTT).** iGTT was performed in all rats (n=79) after 6 weeks of exposure to either chow or high-fat diet. After 18hr fasting, rats were given an intraperitoneal injection of 20% glucose solution (10mL/kg). Blood was collected by tail vein laceration and blood glucose levels were recorded prior the injection and 30, 60 and 180min post injection using Accu-Chek glucometer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

**Sacrifice and tissue collection.** After being deeply anesthetized with Pentobarbital (50mg/kg), rats were rapidly decapitated. Blood was collected in EDTA containing tubes, centrifuged at 4 °C, and plasma was then frozen at –80 °C, until hormones measurements. Perigonadal adipose tissue was carefully dissected and weighted.

**Plasma metabolic hormones measurement.** Leptin and insulin levels were measured using a Multiplex MAP Magnetic Bead-based immunoassay kits (Millipore Corp, Billerica, MA) according to the manufacturer instructions. Triglycerides and cholesterol levels were assessed using colorimetric and enzymatic methods with commercial kits (Biomerieux, Marcy-l'Etoile, France).

## **Experiment 2: Impact of early stress and maternal high-fat diet on food-motivated behavior in adolescent and adult rats**

At PND55, rats fed a chow diet underwent behavioral testing in the runaway paradigm (Barbano and Cador, 2005). The runaway apparatus consisted of a straight plastic alley (180cm long x 14cm wide x 30cm high) with a start compartment and goal compartment (19x14x30cm) attached on both ends. A sliding door separated the starting compartment from the alley. Chow pellets as food reward were placed into the far end goal compartment. Before the beginning of the experiment, rats were food-deprived for 24hrs. To habituate rats to the apparatus, they were placed into the goal compartment containing chow pellets for 1min and were then allowed to freely explore for 5min. During training, rats were submitted to 5 trials

per day for 6 days. After reaching the reward, rats were maintained for 15sec into the goal box before starting the next trial. On the 6<sup>th</sup> day of training, the mean latency to reach the goal box over the 5 trials was measured by an automatic videotracking system (Viewpoint, Lyon, France). A restricted feeding protocol (15g of food/day) was applied throughout the 5 days of training and on the 6<sup>th</sup> testing day. To explore the motivation for palatable food, rats were then switched to *ad libitum* feeding and mean latency to reach the reward (Chocopops, Kellogg's©) over 5 trials was measured. In order to avoid neophobia, rats were exposed to chocopops in their homecage the day before testing.

At 8 months, another subset of rats was used to evaluate motivation for palatable food in operant cages. In this experiment, animals were food-deprived on the first 24hrs and then submitted to food restriction (85% of body weight) throughout the experiment. For the habituation to the apparatus, rats were placed into the operant chambers (Imetronic, Pessac, France) with no lever for 15min with 10 food pellets in the magazine. On the second day, rats received magazine training for 30min. The two levers were presented, and pellets were dispensed into the magazine on fixed time interval (3min), and a new food pellet was distributed only when the previous one had been consumed. Rats were then trained on a Fixed Ratio 1(FR-1) schedule, in which one active lever press resulted in delivery of one pellet (5TUM, 54.1% carbohydrate with 3.1 % of sucrose, 8.5% of fat, 19.9% protein, 3.30kcal/g, TestDiet Purified Rodent Tablet, Richmond, USA). Rats underwent daily 30min-FR-1 session until they reach the criteria of 75 pellets obtained. Then, the schedule changed to a 30min-FR-5 in which rats earned one pellet after 5 active lever presses. When all rats acquired the criteria of 75 rewards in the FR-5 schedule, they were run on a Progressive Ratio 3 (PR-3) (increment by three active lever presses at each reward earned). This schedule of reinforcement was used to assess motivation for a palatable reward (high-sucrose pellets, 5TUL: 57.5% carbohydrate with 46.6% of sucrose, 9.8% fat, 17.7% protein, 3.44 kcal/g, TestDiet Purified Rodent Tablet, Richmond, USA). To prevent neophobia during the task, animals were given few of these palatable pellets in the home cage the day before testing. Breakpoint was defined as the maximum of consecutive lever presses to earn a single pellet during the whole session of 90min or the last consecutive lever presses achieved before the cut-off of 15min if the animal stopped pressing. Rats underwent one session of PR-3 under food restriction and were then switched to *ad libitum* feeding for another PR-3session.

**Statistical analysis**

Normality was assessed using Shapiro-Wilk test. Data were analyzed using two-way ANOVAs, in which maternal diet and early stress effects were tested. When interactions between the two factors were found, the post-hoc Fisher's LSD test was used to compare the differences between the groups. Statistical significance was set at  $p < 0.05$

## RESULTS

### Dams and pups' body weights

At the end of the gestation, dams' body weight did not differ [ $t_{(15)}=0.96$ ,  $p>0.05$ ]. However, at postpartum day1, we observed that high fat-fed dams displayed a lower body weight compared to standard-fed dams (respectively  $353.3 \pm 4.6\text{g}$  vs.  $329.9 \pm 3.4\text{g}$ ,  $t_{(46)}=4.08$ ,  $p<0.001$ ).

However, maternal HFD did not have any impact on litter size (SD:  $12.5 \pm 0.7$  vs. HFD:  $13.0 \pm 0.5$ ) and did not alter pups' body weight at birth [HFD:  $6.8\text{g} \pm 0.20$  and SD:  $7.0\text{g} \pm 0.15$ ,  $p>0.05$ ]. At weaning (PND21), maternal HFD exposure led to a transient decrease in pups' body weight [ $F_{(1,44)}=4.97$ ,  $p=0.03$ ], which did not persist. Indeed, at PND36, offspring of dams fed a HFD exhibited an increased body weight compared to offspring of dams fed a SD [ $F_{(1,71)}=8.07$ ,  $p=0.006$ ]. This result suggests a compensatory catch up growth between PND21 and PND36. There was no effect of early stress on body weight either at PND21 or PND36 [ $p>0.05$ , data not shown].

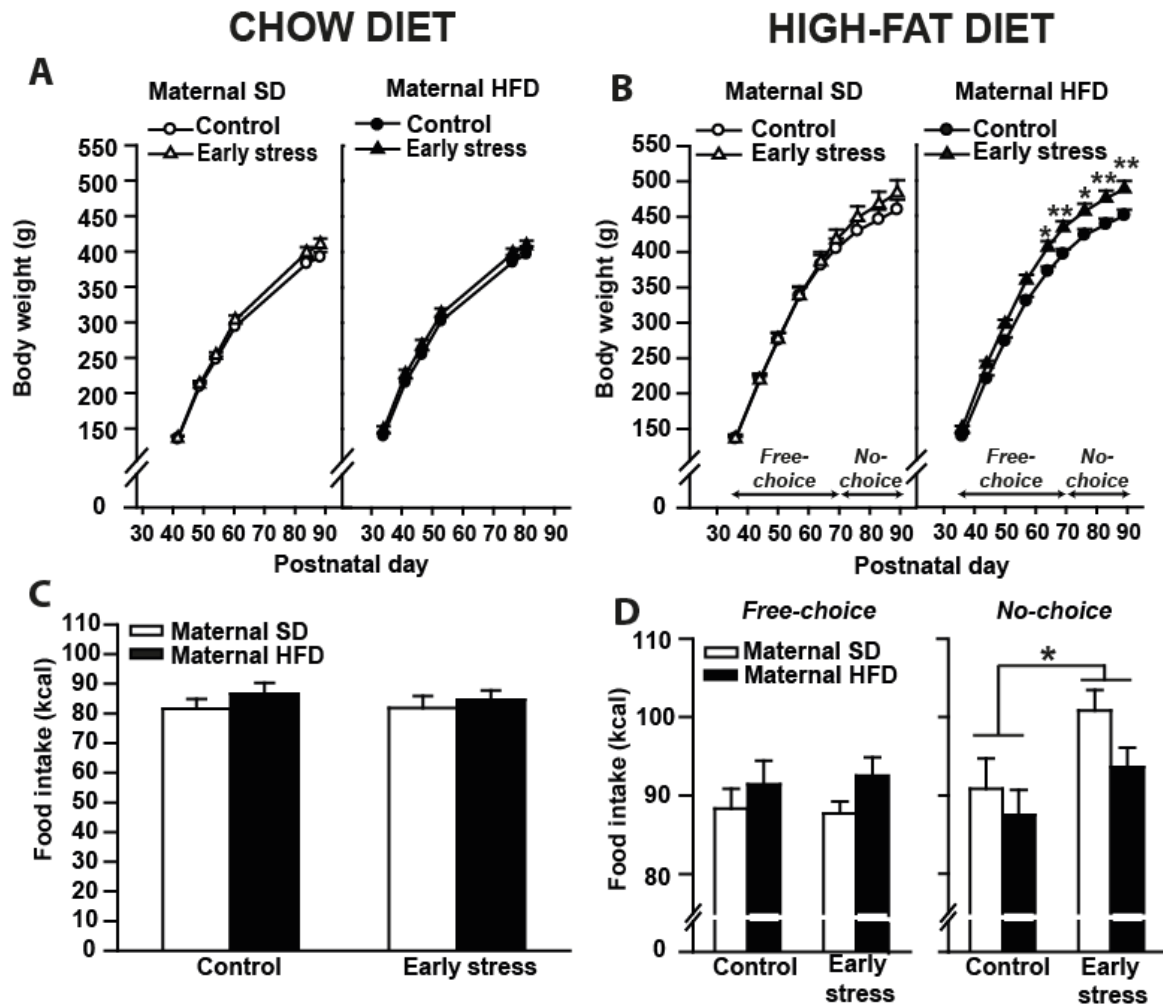
### Food intake and body weight in chow and high fat-fed offspring

Growth curve of chow diet-fed offspring is shown in **Figure 1A**. Despite a trend toward an increased body weight in early stressed rats, there was no significant difference between groups [early stress,  $F_{(1,36)}=3.28$ ,  $p=0.08$ ; maternal diet,  $p>0.05$  and early stress x maternal diet,  $p>0.05$ ].

**Figure 1B** shows body weight evolution over the 8 weeks of exposure to HFD. There is a main effect of diet, with an overall increase of body weight when animals are fed with high fat [ $F_{(1,71)}=79.76$ ,  $p<0.001$ ]. Overall, when early stressed offspring had access to a palatable HFD, they showed an enhanced body weight compared to controls [ $F_{(1,35)}=5.46$ ,  $p<0.05$ ]. An additional analysis was conducted in order to examine body weight growth depending on maternal diet. This analysis revealed that while early stress did not have any significant effect in offspring of standard-fed dams [ $F_{(1,17)}=0.28$ ,  $p>0.05$ ], it increased it in offspring of high fat-fed dams [ $F_{(1,18)}=9.85$ ,  $p=0.006$ ].

Moreover, all groups presented similar daily food intake [**Figure 1C**, early stress,  $F_{(1,36)}=1.20$ ,  $p>0.05$ ; maternal diet,  $F_{(1,36)}=0.06$ ,  $p>0.05$  and early stress x maternal diet,  $F_{(1,36)}=1.00$ ,  $p>0.05$ ]. As shown in **Figure 1D**, daily caloric intake was not different between groups in the

choice condition [ $F_{(1,35)}=2.76$ ,  $p>0.05$ ]. However, early stressed rats on no-choice high-fat diet exhibited an increase in caloric intake [ $F_{(1,35)}=6.47$ ,  $p=0.01$ ].



**Figure 1: Impact of early stress and/or maternal high-fat diet on body weight (in g) (A-B) and food intake (in kcal) (C-D) in rats fed a chow diet (left panel) and in rats fed a high-fat diet (right panel).** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Body weight and food intake were not affected by maternal diet or early stress in chow-fed rats. In high fat-fed animals, early stress did not have any effect on body weight in offspring born to standard-fed dams, but potentiated body weight gain in offspring born to high fat-fed dams. In the free choice condition, all groups presented similar food intake. However, in the no choice condition, early stress increased food intake. \*  $p<0.05$  and \*\* $p<0.01$ .

As shown in **Table 1**, early stress did not influence metabolic hormone levels when animals are fed with standard chow. However, offspring of high fat-fed dams showed higher fasting blood glucose levels [ $F_{(1,36)}=4.48$ ,  $p<0.05$ ] and a tendency toward an impaired glucose tolerance in the iGTT as indicated by the increased AUC [ $F_{(1,36)}=3.92$ ,  $p=0.06$ ]. Leptin and insulin levels were unchanged [ $p>0.05$ ]. However, there was significant higher cholesterol [ $F_{(1,34)}=5.65$ ,  $p<0.05$ ] and a trend toward elevation of triglyceride levels [ $F_{(1,34)}=3.59$ ,  $p=0.07$ ] in offspring born to high fat-fed dams. Despite no significant change in body weight in animals fed a standard chow, early stressed rats exhibited greater adipose tissue depots [ $F_{(1,36)}=5.05$ ,  $p<0.05$ ].

**Table 2** shows metabolic parameters in rats fed a high-fat diet in adulthood. When compared to animals fed with chow diet, rats exposed to the palatable HFD during 8 weeks exhibited a significant decrease in basal glucose levels [ $F_{(1,71)}=6.53$ ,  $p=0.01$ ] but higher AUC in the iGTT [ $F_{(1,71)}=67.37$ ,  $p<0.001$ ], leptin [ $F_{(1,64)}=29.75$ ,  $p<0.001$ ], insulin [ $F_{(1,66)}=5.46$ ,  $p=0.02$ ], triglycerides [ $F_{(1,67)}=14.59$ ,  $p<0.001$ ] and adipose tissue [ $F_{(1,71)}=86.44$ ,  $p<0.001$ ]. High-fat exposure after weaning did not have any impact on plasma cholesterol levels [ $F_{(1,67)}=0.02$ ,  $p>0.05$ ]. When they were exposed to high fat diet, all experimental groups showed similar levels of fasting glucose, AUC in iGTT, leptin, cholesterol, and TG levels [ $p>0.05$ ]. However, there was an interaction between early stress and maternal diet for insulin level [ $F_{(1,32)}=16.34$ ,  $p<0.001$ ]. Post-hoc analysis revealed that maternal HFD increased insulin levels in the control group, but has no effect in early stress group. In contrast, in rats exposed to maternal SD, early stressed offspring displayed significantly higher insulin levels [Fisher's LSD post hoc, at least  $p<0.01$ ]. In rats fed a HFD, early stress led to greater perigonadal adipose tissue compared to controls [**Table 2**,  $F_{(1,35)}=5.06$ ,  $p<0.05$ ].



**Table 1: Metabolic parameters in rats fed a chow diet after weaning**

CHOW DIET					
	CONTROL		EARLY STRESS		Statistics
	Maternal SD	Maternal HFD	Maternal SD	Maternal HFD	
Glucose (mM)	5.5 ± 0.1	5.9 ± 0.2	5.7 ± 0.2	5.9 ± 0.2	Maternal diet, $p<0.05$ HF>SD
AUC in iGTT	1244.5 ± 22.9	1273.2 ± 22.3	1194.7 ± 45.8	1286.3 ± 24.7	Maternal diet, $p=0.06$
Leptin (ng/mL)	3.2 ± 0.6	2.9 ± 0.5	2.9 ± 0.6	4.5 ± 0.6	<i>n.s</i>
Insulin (ng/mL)	3.1 ± 0.5	3.3 ± 0.5	3.1 ± 0.5	2.9 ± 0.3	<i>n.s</i>
Cholesterol (g/L)	1.3 ± 0.0	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.1	Maternal diet, $p<0.05$ HF>SD
Triglycerides (g/L)	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	Maternal diet, $p=0.07$
Adipose tissue (g)	7.1 ± 0.5	6.6 ± 0.3	7.6 ± 0.5	8.1 ± 0.5	Early stress, $p<0.05$ Early stress > Control
Body weight (g)	392 ± 7.0	410 ± 8.1	397 ± 10.4	409 ± 6.7	<i>n.s</i>

Data are expressed by mean ± SEM. Values with different subscript are significantly different, at least ,  $p<0.05$ . SD: Standard diet, HFD: High-Fat Diet, AUC: Area Under the Curve for glucose during the IGTT.

**Table 2: Metabolic parameters in rats fed a palatable HFD after weaning**

HIGH FAT DIET					
	CONTROL		EARLY STRESS		Statistics
	Maternal SD	Maternal HFD	Maternal SD	Maternal HFD	
Glucose (mM)	5.3 ± 0.2	5.5 ± 0.2	5.6 ± 0.2	5.3 ± 0.2	<i>n.s</i>
AUC in iGTT	1484.4 ± 48.8	1545.1 ± 59.1	1498.6 ± 52.2	1528.1 ± 73.1	<i>n.s</i>
Leptin (ng/mL)	6.3 ± 0.9	6.9 ± 1.1	5.2 ± 0.9	5.9 ± 0.6	<i>n.s</i>
Insulin (ng/mL)	3.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.6 <sup>b</sup>	4.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	Interaction, $p<0.001$
Cholesterol (g/L)	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.1	<i>n.s</i>
Triglycerides (g/L)	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.1	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.2	<i>n.s</i>
Adipose tissue (g)	11.2 ± 1.2	10.2 ± 0.6	12.6 ± 0.6	12.6 ± 0.8	Early stress, $p<0.05$
Body weight (g)	460 ± 14.2	484 ± 18.1	450 ± 8.3	488 ± 11.1	Early stress, $p<0.05$

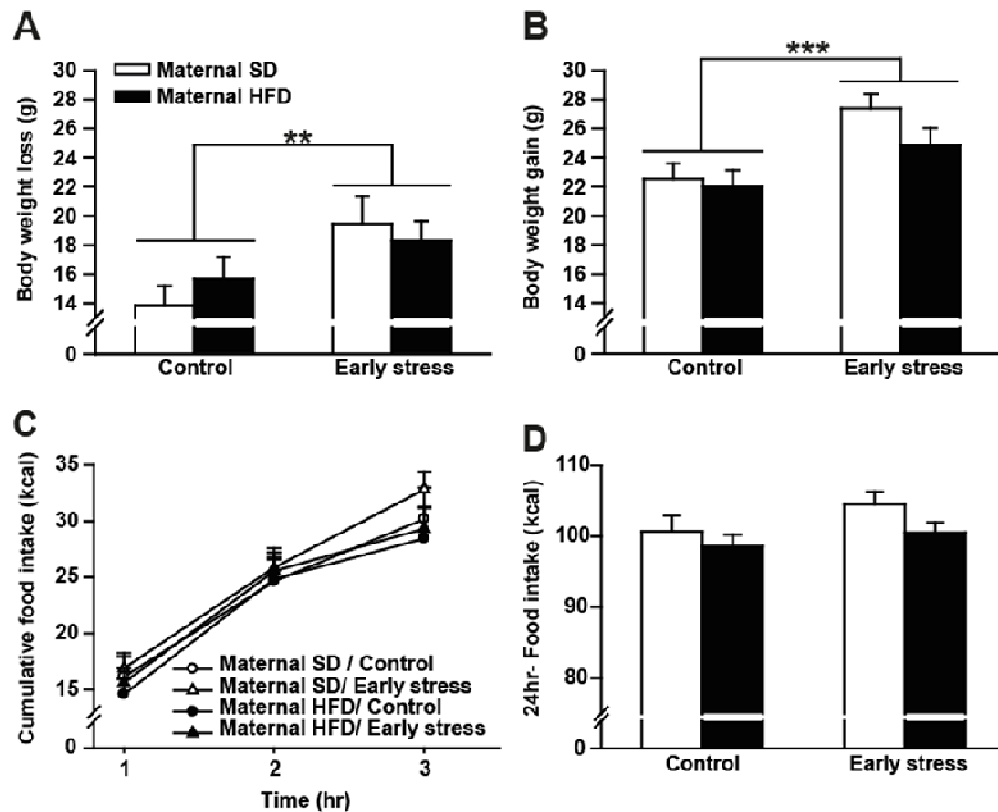
Data are expressed by mean ± SEM. Values with different subscript are significantly different, at least ,  $p<0.05$ . SD: Standard diet, HFD: High-Fat Diet, AUC: Area Under the Curve for glucose during the IGTT.

### **Response to a fasting-refeeding challenge**

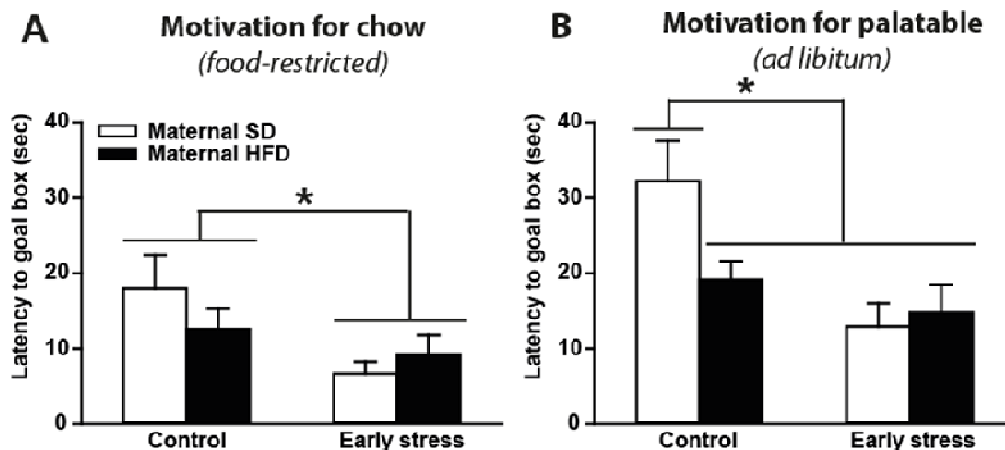
Chow-fed rats that underwent the 18hr-fast lost body weight but a significant difference in body weight loss was found between control and early stressed rats. The early stress group lost significantly more weight during fasting as compared to control group [**Figure 3A**,  $F_{(1,36)}= 7.21$ ,  $p<0.01$ ] and early stress animals gained significantly more weight after re-feeding [**Figure 3B**,  $F_{(1,36)}= 13.06$ ,  $p<0.001$ ]. No significant difference in food intake during the first 3hrs [**Figure 3C**, time effect:  $F_{(2,72)}=174.83$ ,  $p<0.001$ ; maternal diet and early stress,  $p>0.05$ ] or over the 24-hour refeeding period was found between groups [**Figure 3D**: early stress,  $F_{(1,36)}=3.00$ ,  $p=0.09$ ; maternal diet,  $p>0.05$ ]. Food efficiency calculation indicated that rats submitted to stress early in life exhibited higher food efficiency [data not shown,  $F_{(1,36)}=19.82$ ,  $p<0.001$ ].

### **Food-motivated behavior**

Latency to reach a food reward was measured as an index of food motivation in both food-restricted and sated animals. In the food-restriction condition, the reward was chow pellets (**Figure 4A**). While maternal HFD did not have any effect [ $p>0.05$ ], early stress increased motivation in food restricted-rats [ $F_{(1,36)}=6.00$ ,  $p<0.05$ ]. There was no interaction between early stress and maternal diet [ $p>0.05$ ]. In the satiety condition, chocopops were used as a palatable reward (**Figure 4B**). When animals were sated, there was no main effect of maternal diet on food-motivated behavior [ $p>0.05$ ]. However, there was a significant effect of early stress [ $F_{(1,36)}=9.66$ ,  $p<0.01$ ] and an interaction between early stress and maternal diet [ $F_{(1,36)}=3.83$ ,  $p=0.05$ ]. Fisher post hoc analysis revealed that adolescent rats exposed to either maternal HFD alone or early stress exhibited a shorter mean latency to reach the reward, showing an increased motivated-behavior compared to control offspring (control-maternal SD vs. all others, at least  $p<0.05$ ).



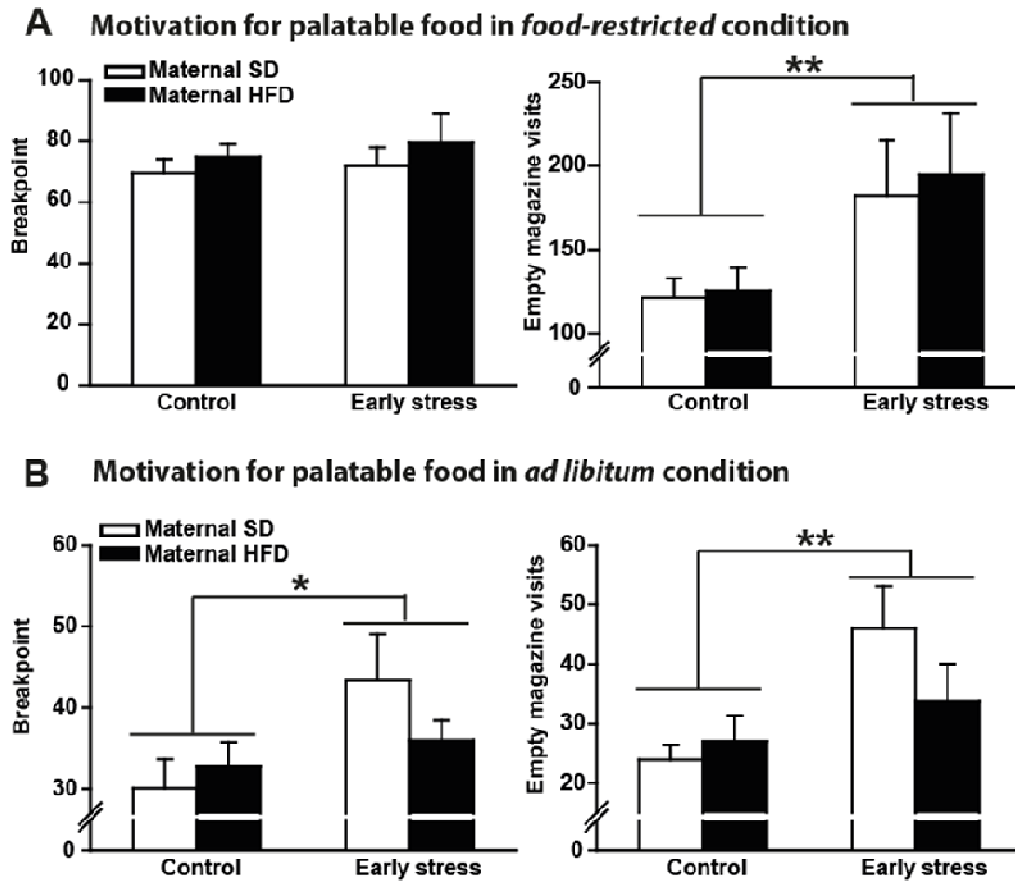
**Figure 3: Impact of early stress and/or maternal diet on body weight variations after a fasting/refeeding challenge.**(A) Body weight loss over a 16hr-fasting period (g), (B) body weight gain over a 24hr-refeeding period (g), (C) cumulative food consumption over the first 3hrs of refeeding (in kcal) and (D) total food intake over the 24hr-refeeding period (in kcal). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Rats exposed to early stress exhibited an exaggerated fasting-induced weight loss and an increase in refeeding-induced weight gain. However, no significant change in food intake was reported during neither the 3hrs nor the 24hr-refeeding period. HFD: high-fat diet and SD: standard diet. \*\*  $p<0.01$  and \*\*\*  $p<0.001$ .



**Figure 4: Impact of early stress and/or maternal high-fat diet on food-motivated behavior of adolescent rats in the straight alley paradigm.** (A) Latency (in sec) to reach the goal box containing either chow pellets in food restriction condition or (B) palatable food in the *ad-libitum* feeding condition. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Early stressed animals displayed shorter latency to reach the food reward in the food-restriction condition. In the free-fed condition, offspring exposed to either maternal high fat-fed or early stress showed an enhanced motivation for palatable food compared to controls. HFD: high-fat diet and SD: standard diet. \*  $p<0.05$ .

In adulthood, motivation for palatable food was evaluated using operant conditioning. During the training phases, there was no significant difference between groups in active lever presses in FR-1 and FR-5 schedules [data not shown, mean of 4 sessions of FR1, maternal diet  $F_{(1,31)}=2.59$ ,  $p>0.05$ ; early stress,  $F_{(1,31)}=1.15$ ,  $p>0.05$ , early stress x maternal diet,  $F_{(1,31)}=0.15$ ,  $p>0.05$ ; mean of 4 sessions of FR5, maternal diet  $F_{(1,31)}=1.80$ ,  $p>0.05$ ; early stress,  $F_{(1,31)}=0.71$ ,  $p>0.05$ , early stress x maternal diet,  $F_{(1,31)}=0.79$ ,  $p>0.05$ ]. As shown in **Figure 5A** (left panel), when animals were food-restricted, neither maternal HFD nor early stress had significant effect on motivation for palatable pellets. Indeed, all rats presented similar breakpoint during the PR-3 schedule of reinforcement [maternal diet, early stress and maternal diet x early stress  $p>0.05$ ]. However, early stressed rats made significantly more visits to the empty food magazine [maternal diet,  $p>0.05$ ; early stress,  $F_{(1,31)}=7.95$ ,  $p=0.008$  and maternal diet x early stress,  $p>0.05$ ; **Figure 5A**, right panel].

As shown in **Figure 5B** (left panel), *ad libitum* feeding induced a reduction of breakpoint, revealing the effect of satiety. While no effect of maternal HFD was observed, rats that had experienced stress in early life presented a higher breakpoint compared to control rats [maternal diet,  $p>0.05$ ; early stress:  $F_{(1,31)}=3.92$ ,  $p=0.05$  and maternal diet x early stress,  $p>0.05$ ]. The number of empty food magazine visits was also greater in these early stressed animals [early stress:  $F_{(1,31)}=7.71$ ,  $p<0.01$ ; **Figure 5B**, right panel] but no main effect of maternal diet effect or interaction were found [maternal diet,  $p>0.05$  and maternal diet x early stress  $p>0.05$ ].



**Figure 5: Impact of early stress and/or maternal high-fat diet on food-motivated behavior for palatable pellets of adult rats in operant conditioning chambers.** Breakpoint (left panel) and number of visits to empty magazine (right panel) during the PR-3 schedule of reinforcement in adult rats under food-restriction (A) or *ad-libitum* feeding (B). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Neither maternal high-fat diet nor early stress influenced motivation for chow pellets in food-restricted rats. However, early stress increased visits to empty food magazine. Adult rats exposed to stress early in life were more motivated for palatable pellets in *ad libitum* feeding condition and made more visits to empty food magazine.\*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ .

## DISCUSSION

Early life can have long-term consequences on the offspring health. Recent studies highlight that the origins of obesity and metabolic disorders in adulthood can be traced back to environmental factors during the perinatal period. Animal models suggest that maternal high-fat feeding and early stress can program offspring metabolic phenotype and influence body weight gain in adulthood, but the combination of both had not been addressed. Therefore, the present study aimed to determine whether maternal HFD could interact with a history of stress early in life and modify metabolic responses to nutritional challenges and food-motivated behavior.

According to previous studies (Carlin et al., 2013a; Couvreur et al., 2011; Ferezou-Viala et al., 2007; King et al., 2014; Platt et al., 2014), we did not observe any change on offspring body weight regarding to maternal diet. However, this result is not in line with others study showing that offspring exposed to HFD during gestation and lactation display higher body weight in adulthood (Naef et al., 2011; Tamashiro et al., 2009; Volpato et al., 2012). These discrepancies may be explained by the type of diet used or the duration of exposure. Despite no change in body weight, maternal HFD induced metabolic dysfunctions such as hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, hyperglycemia and glucose intolerance in adult offspring. This suggests that maternal HFD, independently of maternal obesity, has long-term effects on offspring metabolic phenotype. It could be hypothesized that these metabolic changes may be related to the susceptibility to diabetes or cardiovascular diseases later in life in offspring born to high fat-fed dams (Elahi et al., 2009; Khan et al., 2004). The mechanisms underlying these metabolic changes are still unknown. However, it has recently been shown that maternal HFD can modulate lipids homeostasis and glucose metabolism in offspring (Zheng et al., 2014).

While early stress did not have any impact of body weight in chow-fed rats, rats exposed to early stress were heavier when exposed to a HFD in adulthood. This increase in body weight was not associated with neither an increase in total food intake nor higher consumption of high-fat diet over the 5weeks of free choice. In accordance with another study (Ryu et al., 2008), we showed that early stressed offspring were more vulnerable to a cycle fasting-refeeding. Indeed, rats exposed to early stress gained more weight during the refeeding period, despite no change in food intake. We demonstrated that early stressed rats displayed higher food efficiency indicating a reduced energy expenditure, which could explain their enhanced weight gain during the refeeding period but also after high-fat exposure in

adulthood. Moreover, recent data suggest that early stress animals display alterations of mitochondrial metabolism-related molecules in the adipose tissue, which could facilitate adipose tissue proliferation (Miki et al., 2013).

Maternal HFD potentiated the high fat-induced weight gain in early stressed rats, suggesting that the combination of high-fat and stress exposure during early life sensitizes to weight gain in an obesogenic environment. This enhanced body weight gain in early stressed offspring of HFD dams was associated with higher adipose tissue in early stress rats but not associated with modifications in plasma levels of metabolic parameters assessed. In contrast, we showed that insulin levels were normalized by maternal HFD in the early stress group. Since no change in body weight was observed in chow-fed diet, it appears that high-fat diet exposure after weaning triggers body weight dysregulations in early stressed offspring born to high fat-fed dams. Early stressed offspring of standard fed dams displayed rapid weight gain when they were switched to HFD without choice, which strengthens the idea that early stress leads to an overall increase in metabolic vulnerability to obesogenic environment. Further studies would be necessary to understand the mechanisms by which HFD in adulthood interacts with the early life to modify susceptibility to weight gain. Interestingly, it has been demonstrated that fat storage in rats subjected to HFD correlates with food-motivated behavior (la Fleur et al., 2007).

Here, we report that adolescent rats that have been subjected to early stress exhibited higher motivation for chow under food-restriction and an enhanced motivation for palatable food in *ad libitum* feeding condition. In addition, similarly to early stress, maternal HFD also enhanced motivation for palatable food. This result is in line with previous studies showing that offspring born to high fat-fed dams display a higher rewarding value of food and a greater preference for palatable foods (Gugusheff et al., 2013; Ong and Muhlhausler, 2011). During adolescence, there is a high sensitivity to the reward value of food (Friemel et al., 2010) and a greater vulnerability to addictive-like behaviors (Gladwin et al., 2011). In the present study, the increase in motivation for palatable food in maternal HFD offspring was observed only during adolescence but not in adulthood, suggesting a transient effect of maternal high-fat diet exposure.

Further, we studied food-motivated behavior in adulthood using operant conditioning chambers. Unlike in adolescence, there was no effect of early stress on motivation for food under food-restriction. However, under *ad libitum* feeding, adult rats exposed to early stress exhibited higher operant responses for palatable high-fat/high-sucrose pellets, suggesting that

early stress induces persistent enhanced motivation for palatable food across the lifespan. The hedonic properties of palatable food play an important role in the drive to eat even if the metabolic needs are fulfilled (Berthoud, 2011; Lutter and Nestler, 2009). Palatable foods activate dopaminergic and opioid signaling pathways within the mesolimbic system involved in reward processing (Fulton, 2010). There is a growing of evidence of distinction between “liking” and “wanting” components of food reward (Finlayson and Dalton, 2012). The higher motivation for palatable food in early stressed rats was not associated with higher consumption of high-fat diet in the choice condition, suggesting that “wanting” rather than “liking” component is affected by early stress. “Wanting” in the absence of “liking” is thought to be involved in drug addiction and there are similarities between palatable food and drug in behavioral outcomes and brain activation (Avena, 2011; Hone-Blanchet and Fecteau, 2014). Therefore, the enhanced motivation in early stressed rats is in line with their increased vulnerability to drug addiction in adulthood (Moffett et al., 2007). Here we found that early stressed rats displayed a higher number of visits to empty food magazine. This “impulsive like behavior”, often described as part of the behavioral effect of drug of abuse (Perry and Carroll, 2008), strengthen the hypothesis of an “addiction-like” effect of palatable food in early stressed animal.

## CONCLUSION

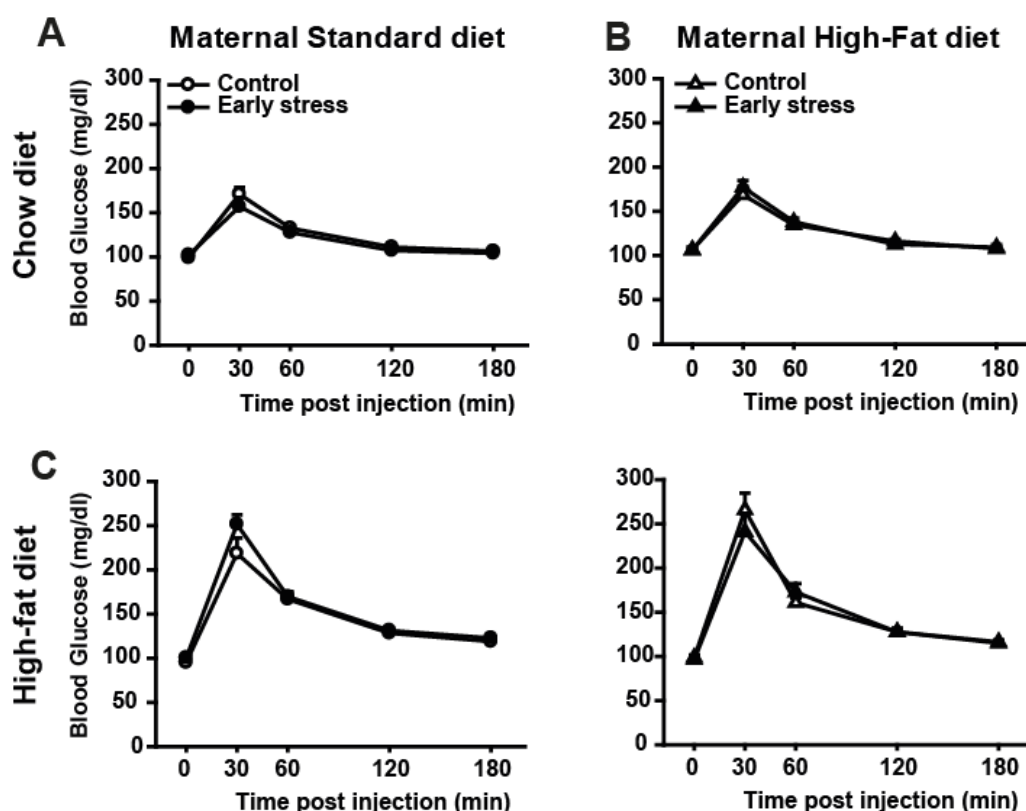
Altogether, our results demonstrate that early stress exerts long-lasting effects on food-motivated behavior and sensitizes to metabolic dysfunctions later in life, especially when animals are fed a palatable high-fat diet in adulthood. Maternal HFD, independently of maternal obesity, produces metabolic alterations in adulthood but no change in body weight. The early history of stress and maternal HFD seem to interact with diet in adulthood, to increase the vulnerability to weight gain in an obesogenic environment. Our findings provides new evidence of programming of feeding behavior and metabolic phenotype by early stress, which are in line with epidemiological studies showing that the prevalence for eating disorders and obesity is higher in individuals experiencing adversity in childhood. Further studies will be necessary to unravel the molecular pathways underlying this programming effect of early stress.



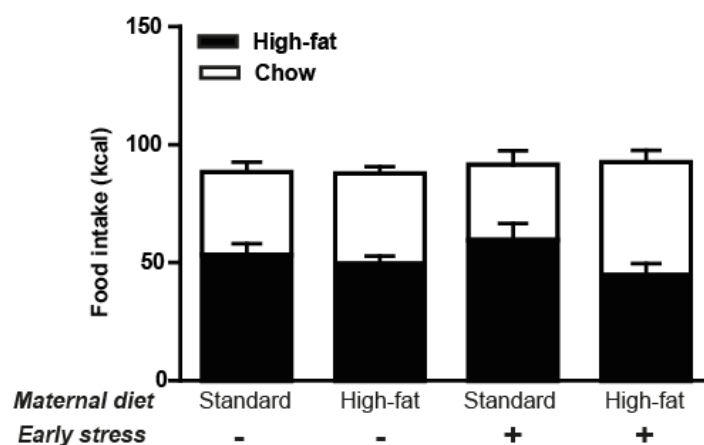
## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by the by University of Bordeaux, Projet Inter-régions Aquitaine Midi Pyrénées and INRA. ALL was supported by a stipend of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors thank Mathieu Cadet and Stéphane Lelgouach for animal care.

## SUPPLEMENTARY DATA



**Supplementary Figure 1: Impact of early stress and/or maternal high-fat diet on the intraperitoneal glucose tolerance test.** Time course of blood glucose level following intraperitoneal injection of glucose (20%) in chow-fed offspring (upper panel) or high fat-fed offspring (down panel). Overall post-weaning exposure to high-fat increased glucose levels ( $p < 0.001$ ) but there was no difference between groups.



**Supplementary Figure 2: Impact of early stress and/or maternal high-fat diet on food ingested in the free choice high-fat condition.** Mean amount of energy (kcal) coming from chow or high-fat diet over the five weeks of exposure to free choice high-fat diet in the different groups. Offspring of high fat-fed dams displayed a reduction in kcal ingested from high-fat diet compared to offspring of standard-fed dams ( $p < 0.05$ ).

## REFERENCES

- Avena, N.M. (2011). Food and addiction: implications and relevance to eating disorders and obesity. *Curr Drug Abuse Rev* 4, 131-132.
- Barbano, M.F., and Cador, M. (2005). Various aspects of feeding behavior can be partially dissociated in the rat by the incentive properties of food and the physiological state. *Behav Neurosci* 119, 1244-1253.
- Bayol, S.A., Farrington, S.J., and Stickland, N.C. (2007). A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br J Nutr* 98, 843-851.
- Bayol, S.A., Simbi, B.H., and Stickland, N.C. (2005). A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *J Physiol* 567, 951-961.
- Bernardi, J.R., Ferreira, C.F., Senter, G., Krolow, R., De Aguiar, B.W., Portella, A.K., Kauer-Sant'anna, M., Kapczinski, F., Dalmaz, C., Goldani, M.Z., and Silveira, P.P. (2013). Early life stress interacts with the diet deficiency of omega-3 fatty acids during the life course increasing the metabolic vulnerability in adult rats. *PLoS One* 8, e62031.
- Berthoud, H.R. (2011). Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? *Curr Opin Neurobiol* 21, 888-896.
- Blasbalg, T.L., Hibbeln, J.R., Ramsden, C.E., Majchrzak, S.F., and Rawlings, R.R. (2011). Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am J Clin Nutr* 93, 950-962.
- Carlin, J., George, R., and Reyes, T.M. (2013). Methyl donor supplementation blocks the adverse effects of maternal high fat diet on offspring physiology. *PLoS One* 8, e63549.
- Couvreux, O., Ferezou, J., Grippo, D., Serougne, C., Crepin, D., Aubourg, A., Gertler, A., Vacher, C.M., and Taouis, M. (2011). Unexpected long-term protection of adult offspring born to high-fat fed dams against obesity induced by a sucrose-rich diet. *PLoS One* 6, e18043.
- D'argenio, A., Mazzi, C., Pecchioli, L., Di Lorenzo, G., Siracusano, A., and Troisi, A. (2009). Early trauma and adult obesity: is psychological dysfunction the mediating mechanism? *Physiol Behav* 98, 543-546.
- Egecioglu, E., Skibicka, K.P., Hansson, C., Alvarez-Crespo, M., Friberg, P.A., Jerlhag, E., Engel, J.A., and Dickson, S.L. (2011). Hedonic and incentive signals for body weight control. *Rev Endocr Metab Disord* 12, 141-151.
- Elahi, M.M., Cagampang, F.R., Mukhtar, D., Anthony, F.W., Ohri, S.K., and Hanson, M.A. (2009). Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *Br J Nutr* 102, 514-519.
- Ferezou-Viala, J., Roy, A.F., Serougne, C., Grippo, D., Parquet, M., Bailleux, V., Gertler, A., Delplanque, B., Djiane, J., Riottot, M., and Taouis, M. (2007). Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R1056-1062.
- Finlayson, G., and Dalton, M. (2012). Current progress in the assessment of 'liking' vs. 'wanting' food in human appetite. Comment on "'You say it's liking, i say it's wanting...". On the difficulty of disentangling food reward in man'. *Appetite* 58, 373-378; discussion 252-375.
- Friemel, C.M., Spanagel, R., and Schneider, M. (2010). Reward sensitivity for a palatable food reward peaks during pubertal developmental in rats. *Front Behav Neurosci* 4. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00039.
- Fulton, S. (2010). Appetite and reward. *Front Neuroendocrinol* 31, 85-103.

- Gladwin, T.E., Figner, B., Crone, E.A., and Wiers, R.W. (2011). Addiction, adolescence, and the integration of control and motivation. *Dev Cogn Neurosci* 1, 364-376.
- Gugusheff, J.R., Ong, Z.Y., and Muhlhausler, B.S. (2013). A maternal "junk-food" diet reduces sensitivity to the opioid antagonist naloxone in offspring postweaning. *FASEB J* 27, 1275-1284.
- Gunstad, J., Paul, R.H., Spitznagel, M.B., Cohen, R.A., Williams, L.M., Kohn, M., and Gordon, E. (2006). Exposure to early life trauma is associated with adult obesity. *Psychiatry Res* 142, 31-37.
- Hone-Blanchet, A., and Fecteau, S. (2014). Overlap of food addiction and substance use disorders definitions: Analysis of animal and human studies. *Neuropharmacology* 85C, 81-90.
- Howie, G.J., Sloboda, D.M., Kamal, T., and Vickers, M.H. (2009). Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol* 587, 905-915.
- Khan, I., Dekou, V., Hanson, M., Poston, L., and Taylor, P. (2004). Predictive adaptive responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring. *Circulation* 110, 1097-1102.
- King, V., Norman, J.E., Seckl, J.R., and Drake, A.J. (2014). Post-weaning diet determines metabolic risk in mice exposed to overnutrition in early life. *Reprod Biol Endocrinol* 12, 73.
- Kirk, S.L., Samuelsson, A.M., Argenton, M., Dhonye, H., Kalamatianos, T., Poston, L., Taylor, P.D., and Coen, C.W. (2009). Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One* 4, e5870.
- La Fleur, S.E., Vanderschuren, L.J., Luijendijk, M.C., Kloeze, B.M., Tiesjema, B., and Adan, R.A. (2007). A reciprocal interaction between food-motivated behavior and diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* 31, 1286-1294.
- Levin, B.E. (2006). Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1107-1121.
- Lutter, M., and Nestler, E.J. (2009). Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. *J Nutr* 139, 629-632.]
- Mason, S.M., Flint, A.J., Field, A.E., Austin, S.B., and Rich-Edwards, J.W. (2013). Abuse victimization in childhood or adolescence and risk of food addiction in adult women. *Obesity (Silver Spring)* 21, E775-781.
- Mcintosh, J., Anisman, H., and Merali, Z. (1999). Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res* 113, 97-106.
- Mcmillen, I.C., and Robinson, J.S. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85, 571-633..
- Miki, T., Liu, J.Q., Ohta, K., Suzuki, S., Kusaka, T., Warita, K., Yokoyama, T., Jamal, M., Ueki, M., Yakura, T., Tamai, M., Sumitani, K., Hosomi, N., and Takeuchi, Y. (2013). Early postnatal maternal separation causes alterations in the expression of beta3-adrenergic receptor in rat adipose tissue suggesting long-term influence on obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 442, 68-71.
- Moffett, M.C., Vicentic, A., Kozel, M., Plotsky, P., Francis, D.D., and Kuhar, M.J. (2007). Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. *Biochem Pharmacol* 73, 321-330.
- Naef, L., Moquin, L., Dal Bo, G., Giros, B., Gratton, A., and Walker, C.D. (2011). Maternal high-fat intake alters presynaptic regulation of dopamine in the nucleus accumbens and increases motivation for fat rewards in the offspring. *Neuroscience* 176, 225-236.
- Nguyen, D.M., and El-Serag, H.B. (2010). The epidemiology of obesity. *Gastroenterol Clin North Am* 39, 1-7.

- Ong, Z.Y., and Muhlhausler, B.S. (2011). Maternal "junk-food" feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB J* 25, 2167-2179.
- Parks, E.P., Kumanyika, S., Moore, R.H., Stettler, N., Wrotniak, B.H., and Kazak, A. (2012). Influence of stress in parents on child obesity and related behaviors. *Pediatrics* 130, e1096-1104.
- Paternain, L., Martisova, E., Milagro, F.I., Ramirez, M.J., Martinez, J.A., and Campion, J. (2012). Postnatal maternal separation modifies the response to an obesogenic diet in adulthood in rats. *Dis Model Mech* 5, 691-697.
- Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., and Stanton, C. (2012). Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. *J Nutr Metab* 2012, 539426.
- Perry, J.L., and Carroll, M.E. (2008). The role of impulsive behavior in drug abuse. *Psychopharmacology (Berl)* 200, 1-26.
- Plagemann, A., Harder, T., Kohlhoff, R., Rohde, W., and Dorner, G. (1997). Overweight and obesity in infants of mothers with long-term insulin-dependent diabetes or gestational diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21, 451-456.
- Platt, K.M., Charnigo, R.J., and Pearson, K.J. (2014). Adult offspring of high-fat diet-fed dams can have normal glucose tolerance and body composition. *J Dev Orig Health Dis* 5, 229-239. doi:
- Ryu, V., Lee, J.H., Yoo, S.B., Gu, X.F., Moon, Y.W., and Jahng, J.W. (2008). Sustained hyperphagia in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. *Int J Obes (Lond)* 32, 1355-1362.
- Spencer, S.J. (2013). Perinatal programming of neuroendocrine mechanisms connecting feeding behavior and stress. *Front Neurosci* 7, 109.
- Tamashiro, K.L., Terrillion, C.E., Hyun, J., Koenig, J.I., and Moran, T.H. (2009). Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* 58, 1116-1125.
- Taylor, P.D., and Poston, L. (2007). Developmental programming of obesity in mammals. *Exp Physiol* 92, 287-298.
- Volpato, A.M., Schultz, A., Magalhaes-Da-Costa, E., Correia, M.L., Aguila, M.B., and Mandarim-De-Lacerda, C.A. (2012). Maternal high-fat diet programs for metabolic disturbances in offspring despite leptin sensitivity. *Neuroendocrinology* 96, 272-284.
- Vucetic, Z., and Reyes, T.M. (2010). Central dopaminergic circuitry controlling food intake and reward: implications for the regulation of obesity. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2, 577-593.
- Walker, C.D., Naef, L., D'asti, E., Long, H., Xu, Z., Moreau, A., and Azeddine, B. (2008). Perinatal maternal fat intake affects metabolism and hippocampal function in the offspring: a potential role for leptin. *Ann N Y Acad Sci* 1144, 189-202.
- Whitaker, R.C. (2004). Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy. *Pediatrics* 114, e29-36.
- Zheng, J., Xiao, X., Zhang, Q., Yu, M., Xu, J., and Wang, Z. (2014). Maternal high-fat diet modulates hepatic glucose, lipid homeostasis and gene expression in the PPAR pathway in the early life of offspring. *Int J Mol Sci* 15, 14967-14983.

### ***Partie III :***

## ***Impact du régime maternel hyperlipidique sur les effets délétères à long terme du stress précoce***

### **Objectifs**

L'adversité pendant l'enfance est à un facteur de risques aux troubles neuropsychiatriques, à l'âge adulte. Nous assistons de nos jours à une augmentation de la consommation de lipides. L'impact de ces changements de cet environnement nutritionnel sur les effets de l'adversité précoce n'est pas connu. Cependant, des travaux chez l'animal suggèrent qu'un régime hyperlipidique à l'âge adulte peut atténuer les altérations comportementales et endocrines induites par la séparation maternelle.

**Le but de cette étude était de déterminer l'impact d'un régime maternel hyperlipidique, pendant la période périnatale, sur les conséquences délétères de la séparation maternelle sur les comportements émotionnels, la sensibilité viscérale et les capacités mnésiques. Par la suite, en vue de déterminer les processus mis en jeu, nous avons examiné dans le cortex préfrontal pendant le développement, les effets du régime maternel hyperlipidique sur l'expression de gènes (Rest4, Bdnf...) impliqués dans les effets à long terme de la séparation maternelle. Enfin, nous avons évalué les effets de la consommation du régime hyperlipidique sur le comportement des mères stressées.**

### **Matériel et méthodes**

Des femelles Wistar ont été nourries avec un régime standard (12% de lipides, 3,9kcal/g) ou un régime hyperlipidique (39% de lipides, 4,9kcal/g) pendant la gestation et la lactation. Entre le 2<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour après la naissance, les ratons ont été séparés de leur mère, 3h par jour. A J21, la descendance mâle a été sevrée et nourries avec le régime standard pendant toute la durée de l'étude. Le comportement émotionnel a été évalué en utilisant le test de l'arène ouverte et le test d'interaction sociale. La mémoire

spatiale a été évaluée grâce à la tâche du labyrinthe aquatique. A l'âge de 8 mois, les rats ont été exposés à un stress modéré et les taux de corticostérone plasmatique et l'activation c-fos dans le noyau paraventriculaire ont été mesurés. Chez ces mêmes groupes, la neurogénèse hippocampique a été examinée par quantification du marquage doublecortine. Dans une deuxième expérience, des ratons âgés de 11 jours ont été sacrifiés, avant la séparation, correspondant ainsi à une condition basale ou après 3h de séparation maternelle. Nous avons mesuré, dans le cortex préfrontal, l'expression de différents gènes clefs dans l'adaptation au stress (BDNF, MR, GR, CRH, etc...). Chez les mères stressées, nous avons évalué le comportement maternel lors du premier jour de séparation maternelle. De plus, nous avons mesuré la consommation alimentaire journalière ainsi que la prise de nourriture pendant les 3h de séparation, au cours des semaines du protocole de séparation maternelle. A la fin des deux semaines de stress, le comportement de type anxieux des mères stressées a été évalué dans le test de la boîte noire et blanche.

**Résultats :** Les tableaux ci-dessous représentent les résultats obtenus de la caractérisation comportementale et neuroendocrine des descendants adultes et l'expression des gènes chez les ratons pendant le développement.

*Tous les sigles représentent les effets par rapport au groupe témoin, (i.e exposé au régime maternel standard et élevé en condition standard de laboratoire). ↗ et ↘ correspondant respectivement à une augmentation et une diminution du paramètre donné par rapport au groupe témoin (sous régime maternel standard et élevé en condition standard de laboratoire). « - » indiquant une absence d'effet. (HL : hyperlipidique)*

**Tableau 6: Impact du régime maternel hyperlipidique sur les effets à long terme de la séparation maternelle chez les descendants à l'âge adulte.**

Paramètres	Séparation maternelle + régime maternel standard	Régime maternel HL	Séparation maternelle + régime maternel HL
Comportements anxieux	↗	-	-
Sensibilité viscérale	↗↗	↗	↗
Mémoire spatiale	↘	-	-
Neurogénèse hippocampique	↘	-	-
CORT plasmatique (post stress)	↗	↗	-
<i>c-fos</i> dans le PVN (post stress)	↘	↘	-

**Tableau 7 : Gènes significativement modulés par le régime maternel et/ou le stress précoce**

Paramètres	Séparation maternelle + régime maternel standard	Régime maternel HL	Séparation maternelle + régime maternel HL
Récepteurs aux glucocorticoïdes (GR)	-	↗	↗
Brain derived neurotrophic factor (Bdnf)	↘	↘	-
Récepteur à la sérotonine 1A (5HT-r1A)	↘	-	-
Corticotropin releasing hormone (Crh)	↗	↘	-



**Tableau 8 : Gènes significativement modulés par le régime maternel et/ou le stress précoce après les 3 heures de séparation maternelle au jour postnatal 11**

Paramètres	Séparation maternelle + régime maternel standard	Séparation maternelle + régime maternel HL
RE-1 Silencing transcription factor (Rest)	↗↗	↗
Rest4	↗↗	↗
Sous-unité NDMA 2b (Grin2b)	↘	↘
Sous-unité AMPA 2 (Gria2)	-	-
Adénylate cyclase 5 (Adcy5)	↗↗	↗
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase2 $\alpha$ (Camk2a)	↗	↗
Nerve growth factor (Ngf)	↗	-
Récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR)	-	-
Récepteurs aux glucocorticoïdes (GR)	↗	-
Brain derived neurotrophic factor (Bdnf)	↗	-
Récepteur à la sérotonine 1A (5HT-r1A)	↗↗	↗
Corticotropin releasing hormone (Crh)	-	↘

*Les flèches indiquent des effets par rapport au niveau d'expression basale avant la séparation aiguë de 3h. Le nombre de flèche indiquant le degré de variation, la comparaison du nombre de flèches entre les rats exposés au régime standard et ceux exposés au régime HL montre les différences intergroupes en réponse au stress aigu de séparation.*

## Discussion

La séparation maternelle entraîne une augmentation des comportements de type anxieux, des altérations de la mémoire spatiale, une hypersensibilité viscérale, ainsi que des perturbations de la réponse neuroendocrine au stress. Ces résultats confortent les données de la littérature. Des études antérieures rapportent une atténuation des altérations comportementales et endocrines associées au stress précoce suite à la consommation d'une nourriture palatable en post-sevrage (Maniam et Morris, 2010b, c).

Nous avons montré pour la première fois, que l'exposition à un régime hyperlipidique, pendant la période périnatale, prévient des altérations à long terme induites par la séparation maternelle.

En accord avec des travaux précédents (Hulshof et al., 2011; Mirescu et al., 2004), nous observons une diminution de la neurogenèse hippocampique, qui pourraient être en partie responsable des déficits comportementaux observés chez les rats exposés à la séparation maternelle. En effet, la neurogénèse hippocampique est impliquée dans la mémoire spatiale (Dupret et al., 2008) dans les comportements de type anxieux (Revest et al., 2009) et dans la régulation de l'axe corticotrope (Schloesser et al., 2009).

Afin d'examiner les processus potentiels mis en jeu dans cet effet protecteur du régime maternel hyperlipidique, nous nous sommes intéressées à l'impact de la séparation maternelle pendant le développement. Une étude récente a mis en évidence l'importance d'un facteur de transcription, Rest4, dans le cortex préfrontal (CPF) pendant le développement, dans les effets à long terme de la séparation maternelle (Uchida et al., 2010). Bien que nous n'ayons pas observé de modifications de l'expression de Rest4 dans le CPF en condition basale, le stress chronique de séparation maternelle diminue l'expression de certains de ses gènes cibles comme le Bdnf, Crh et 5HT-r1A. De façon intéressante, ces altérations sont contrecarrées par l'exposition au régime maternel hyperlipidique. De plus, nous avons montré que le régime maternel hyperlipidique atténue l'induction de l'expression du récepteur à la sérotonine 1A et de l'adénylate cyclase 5 induite par les 3 heures de séparation maternelles, qui résulte probablement de l'atténuation de l'induction de l'expression de leur facteur de transcription Rest et Rest4. De nombreux travaux suggèrent l'importance de ces marqueurs dans la vulnérabilité au stress et les comportements émotionnels (Autry and Monteggia, 2012; Gross et al., 2002; Samaco et al., 2012). Ainsi, l'effet protecteur du régime hyperlipidique sur les altérations neurodéveloppementales dans le cortex préfrontal induites par la séparation maternelle pourrait expliquer l'absence de déficits à long terme chez ces animaux.

La modulation de l'expression de ces marqueurs pourrait passer par des processus épigénétiques, notamment *via* des modulations du comportement maternel (Weaver et al., 2002). Dans notre étude, les mères stressées sous régime maternel hyperlipidique apportent plus de soin aux petits par rapport à des mères stressées sous régime

standard. Par ailleurs, les mères sous régime hyperlipidique augmentent leur prise alimentaire pendant le stress de séparation maternelle. Cependant, la consommation journalière totale chez ces mères ne diffère pas en fonction du régime. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature rapportant une augmentation de nourriture palatable induite par le stress (la Fleur et al., 2005; Pecoraro et al., 2004). A la fin des deux semaines de séparation, les mères stressées sont moins anxieuses sous régime hyperlipidique par rapport aux mères stressées sous régime standard. Ainsi, l'augmentation de la consommation de nourriture palatable hyperlipidique pendant le stress pourrait agir comme un processus de « self medication » comme décrit par Mary Dallman dans la théorie de la « comfort food » (Dallman et al., 2003). Etant donné le lien entre comportement maternel et comportement anxieux des mères (Curley et al., 2012), l'augmentation du comportement maternel observé chez les mères sous régime hyperlipidique pourrait également être liée à la réduction de leur comportement anxieux.

## **Conclusion**

Nous avons montré que le régime maternel hyperlipidique protège contre les altérations neurodéveloppementales et les perturbations à long terme induites par la séparation maternelle.

# **Perinatal high-fat exposure through maternal diet protects against the adverse effects of early life stress**

**Amandine L. Lépinay**<sup>1,2</sup>, Marion Rincel<sup>1,2</sup>, Pauline Delage<sup>1,2</sup>, Jean Fioramonti<sup>3</sup>, Vassilia Théodorou<sup>3</sup>, Sophie Layé<sup>1,2</sup> and Muriel Darnaudéry<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup> INRA, Nutrition et Neurobiologie Intégrée, UMR1286, Bordeaux, France ; <sup>2</sup> Université de Bordeaux, Nutrition et Neurobiologie Intégrée, UMR1286, Bordeaux, France ; <sup>3</sup> INRA, Toxalim, UMR1331, Toulouse, France.

*En préparation*

## **Corresponding author:**

Pr Muriel Darnaudéry  
INRA, Nutrition and Integrative Neurobiology (NutrINeurO),  
University of Bordeaux, UMR1286  
Bâtiment UFR Pharmacie, 2<sup>o</sup> tranche, 2<sup>o</sup> étage, Case courrier 34  
146 Rue Léo Saignat,  
33076 Bordeaux, France.  
**Phone** : +33 5 57 57 12 32  
**Fax** : +33 5 57 57 12 27  
**Email**: muriel.darnaudery@u-bordeaux.fr

**Running title:** Maternal high-fat diet attenuates early stress

**Abbreviation:** ANOVA, Analysis of Variance; MS, Maternal separation; PND, Postnatal Day; PP: Postpartum day; IBS: Irritable Bowel Syndrome; WM, Water Maze; OF, Open-Field; PFC, Prefrontal Cortex, HPA, hypothalamic-pituitary-adrenal; SD: Standard; HF: High-fat; HFD, High fat diet

## **ABSTRACT**

There are strong links between stress and nutrition. For instance, stress drives choices of food rich in fat or sugar and consumption of palatable high-fat food attenuates symptoms associated with chronic stress in adults. Early adversity in childhood is a major predisposing factor for mood and anxiety disorders. However, the influence of the present occidental dietary habits on early stress is unknown. Chronic maternal separation (MS) in rodent mimics several alterations induced by early life adversity. Here, we tested the hypothesis that early exposure to high-fat through maternal diet modifies the phenotype induced by MS. Dams were fed either a standard (SD, 12% of fat) or high-fat (HFD, 39% of fat) diets throughout gestation and lactation. Pups were submitted to MS (3hr per day) from postnatal day (PND) 2 to PND14. We report that MS results in higher anxiety-like behavior and plasma corticosterone levels post-stress, reduced social interaction, spatial memory impairments, decreased hippocampal neurogenesis and visceral hypersensitivity in offspring of standard-fed dams. However, offspring exposed to maternal high-fat diet did not show any of these deleterious effects of MS. In order to better understand the mechanisms underlying the protective effects of maternal HFD, we examine its impact on genes expression in the prefrontal cortex during development and maternal behavior. Perinatal HFD abolishes several alterations of genes expression (BDNF, 5HT<sub>1A</sub>, REST, REST4) reported in pups exposed to maternal separation. Finally, we demonstrate that maternal HFD intake produces a reduction of anxiety and enhances maternal care in stressed dams. Both of these processes might contribute to the protective effects of HFD in early stressed animals.

**Key words:** programming, early stress, gut, comfort food, Rest4, Brain-derived Neurotrophic factor.

## INTRODUCTION

A large literature indicates close interrelations between stress and nutrition (Dallman et al., 2003; Torres and Nowson, 2007). In modern societies, fetus and newborn are exposed to high amount of fat through the maternal diet. However, the consequences of this early nutritional environment on brain function, especially on the vulnerability to stress is unknown. A large body of evidence demonstrates that early life stress in childhood has persistent effects into adulthood and predisposes to neuropsychiatric disorders, such as depression and anxiety (Chapman et al., 2004; Heim and Nemeroff, 2001; Heim et al., 2004). In addition, early adversity is also recognized as a risk factor for the development of Irritable Bowel Syndrome (IBS) (Bradford et al., 2012), a gastrointestinal disorder associated with brain-gut axis dysfunctions. In rodents, maternal separation has been widely used to study the negative consequences of early adversity (O'Mahony et al., 2011; Theodorou, 2013; Vetulani, 2013). Prolonged daily separations of pups from their mother during the early postnatal period, lead to altered neuroendocrine response to stress (Aisa et al., 2007; Francis et al., 2002; Huot et al., 2004; Kalinichev et al., 2002) and exert wide-ranging behavioral consequences in adulthood including cognitive impairments, depressive-like and anxiety-like behavior (Kosten et al., 2012; Millstein and Holmes, 2007). Moreover, animals exposed to MS exhibit visceral hypersensitivity and enhanced intestinal permeability, indicating that maternal separation can also be used as a model of IBS (Barreau et al., 2007; Rosztoczy et al., 2003). The mechanisms underlying the imprinting effects of MS in adults are still not fully elucidated. However, a recent study reports that pups exposed to chronic MS exhibited changes in gene expression of several key markers, involved in structural and functional plasticity, within the prefrontal cortex. The MS-induced REST4 upregulation in the PFC during development has been proposed to underlie the long lasting effects of MS on emotional behavior (Uchida et al., 2010). Cross fostering prevents HPA hyperactivity induced by MS, suggesting that maternal care plays a role in some of the negative effects of MS (Huot et al., 2004). Interestingly, maternal exercise has been shown to counteract some of the deleterious effects of maternal deprivation in adult offspring (Uysal et al., 2011) indicating that environmental intervention on dams can modulate the long-term effects of MS in offspring.

In adult animals, palatable high fat food attenuates some effects associated with chronic stress (Finger et al., 2011; Krolow et al., 2010; Maniam and Morris, 2010a, b, c; Zeeni et al., 2013). However, the impact of exposure to high-fat diet during the perinatal period on the effects of

early stress has not been studied. This question is particularly important in the context of the present nutritional environment, since the majority of the population, including childbearing women and children, consumes an excess of fat especially saturated fatty acids (Cordain et al., 2005; Kearney, 2010) without any idea of the impact on later cognitive and emotional functions. Here we aim to determine whether exposure to high-fat through the maternal diet can modulate the long-term effects of maternal separation. In light of the potential mechanisms involved in the long lasting effects of MS, we further explored the impact of maternal HFD on gene expression in the prefrontal cortex of stressed pups as well as the impact of high-fat consumption on anxiety and maternal behavior in stressed dams.

## **METHODS**

### **Animal and diets.**

Fifty-six nulliparous female and twenty-eight male Wistar (11-week-old) were purchased from Janvier (Le Genest, Saint-Isle, France). Pregnant females were assigned to either standard diet (SD)(16.4 kJ/g, energy 12% fat, 18% protein and 70% carbohydrates) or high-fat diet (HFD) (19.6 kJ/g, energy 39% fat, 15% protein and 46% carbohydrates) (INRA,UPAE- Experimental feeds preparation Unit, Jouy-en-Josas, France). Dams were maintained under these diets from the first day of gestation to postpartum day 21. At postnatal day (PND) 1, litters were culled to 10-12 pups per litter with the sex ratio maintained as close to 1:1 as possible. Of the initial fifty-six dams, forty-eight litters were randomly assigned to either control or maternal separation (MS) groups. At PND21, 60 male pups (n=15 per group) were weaned onto standard diet and housed in groups of four per cages until the testing age. A maximum of two pups per litter was used to prevent from any 'litter effects'. Timeline depicting the experimental design is shown in **Figure 1**.

All the experiments were conducted according to the French (Directive 87/148, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche) and European Directive (2010/63/EU, 2010 September 22th) legislations. The procedures followed in the study were approved, by Région Aquitaine Veterinary Services (Direction Départementale de la Protection des Animaux, approval ID: A33-063-920). Every effort was made to minimize suffering and the number of animals used. Animals were maintained in a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 08:00 h) in a temperature-controlled room (22°C) with free access to food and water.

### **Maternal separation (MS)**

From PND2 to PND14, stressed pups underwent daily maternal separation for 180min. Dams were removed from the home cage and placed in a new cage with free access to food and water. Pups were then individually separated and placed in an adjacent room kept at  $32^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Control pups remained with the dams until weaning.

### **Social interaction test**

In adulthood, pairs of weight-matched rats unfamiliar to each other from the same experimental group were placed together into a new cage lined with bedding, under dim lighting (30 Lux) and recorded by a video camera for 10min. Social behaviors were then scored by an experimenter blind to the experimental conditions using an ethological software (The observer, Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands). Social interaction was defined by the time spent interacting, including sniffing, following, crawling over or under and grooming.

### **Open Field test**

The apparatus consisted in a 100x100 cm square made of wood, with the center illuminated (55 lux). Rats were placed in the corner of the open field and were then traced using videotracking (Bioseb, Vitrolles, France). Number of entries, distance travelled and time spent in the center (40x40cm) were recorded for 10min.

### **Spatial memory in the water maze**

The apparatus consisted of a circular tank (150 cm diameter x 60 cm height) filled with opaque water ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) with a hidden platform (10cm) placed 3cm below the surface. Extra-maze distal visual cues were placed in the testing room and remained in a fixed position throughout the experiment. Spatial learning consisted of four trials per day for six consecutive days during which latency and distance travelled to reach the hidden platform were recorded (Darnaudery et al., 2007). At each session, rats were placed pseudo-randomly in one of four starting location. Any rat that did not found the platform after a maximum of 90s was gently guided to it by the experimenter. After the last session of training, animals were given 48h of



retention time and were tested for reference memory during a 90s probe trial without the platform. The swimming paths were videotracked (Bioseb, Vitrolles, France).

### **Visceral sensitivity**

Colorectal distension (CRD) was performed as previously described (Ait-Belgnaoui et al., 2005). Briefly, each animal was lightly anesthetized with isoflurane, and a latex balloon was inserted into the colon, 1 cm from the anus. The animals recovered for 10 min before CRD. The balloon (2 mm diameter; 2 cm length) was progressively inflated by steps of 0.4 ml, from 0 to 1.2 ml, each step of inflation lasting for 5 min.

**Blood samples for corticosterone measurements.** At 8 months of age, rats were exposed to an acute aversive stimulation (open-field exposure for 10 min). Blood samples were collected from tail vein immediately after the stress exposure and after 1 hr of recovery in the home cage. Tubes were then centrifuged and stored at -80°C until use. Total plasma corticosterone level was measured by radioimmunoassay (RIA) (Richard et al., 2010)

**Brain tissue harvesting.** After the last blood withdrawal, rats (n=31) were deeply anesthetized with Pentobarbital (50mg/kg). They were then intracardially perfused with Phosphate Buffer Solution followed by 4% Paraformaldehyde. After being removed, brains were post-fixed in the same fixative for 24h, cryoprotected in 30% sucrose, snap frozen in isopentane and stored at -80°C until use. Brains were then cut in 40µm coronal sections using a cryostat and stored in a cryoprotectant solution until use.

**C-fos immunohistochemistry.** Immunostaining for c-Fos was used to measure neuronal activation within the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) 1 hour post stress exposure. Free-floating sections containing PVN (-1.80 to -2.12 posterior to Bregma) (Paxinos et al., 1985) were treated as previously described in (Labrousse et al., 2009)

**C-fos counting analysis.** C-fos immunoreactive (IR) cells were counted by the optical fractionator method using a microscope (Olympus, BX51) equipped with an objective(x100), a video camera (Nikon digital camera DMX 1200), and a stereological software (Mercator, ExploraNova, La Rochelle, France). The quantification of c-fos-IR cells was carried out in

two PVN sections by montaging counting frames (150 $\mu$ m x150 $\mu$ m) spaced between 50 $\mu$ m which covered all c-fos immunostaining in PVN sections. Results are expressed as c-fos-IR cells in the total PVN.

### **Hippocampal neurogenesis**

Hippocampal neurogenesis was assessed using Doublecortin (DCX), a marker of immature neurons. One-in-six of hippocampal sections (from bregma 2.30 to 5.20 mm) were treated for doublecortin (DCX) immunoreactivity using a goat polyclonal antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) and a biotinylated donkey anti-goat secondary antibody (1:200, Amersham, Chicago, USA) as previously described in (Lemaire et al., 2006). Adult neurogenesis was evaluated in eight coronal slices of hippocampus. For each rat (n=4 per group), four matched-sections for dorsal (1.06 to -2.06 mm) and ventral (-3.08 to -3.80 mm) hippocampus were selected (Andrade et al., 2013). An experimenter blind to the experimental conditions manually counted DCX-IR cells within the granular cell layer (GCL). The number of DCX-IR cells was then expressed per mm<sup>2</sup>.

### **Lipids content in the milk**

For milk collection, 8-day-old pups were separated from the dam and exposed to anaesthetic ether. Milk was obtained from the stomach and the collected samples were cryo-frozen at -80°C. Lipids were extracted from stomach content according to the Folch procedure (Folch et al., 1957). Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared from gastric contents following the methods of Glass (Glass, 1971). FAME samples were analyzed by gas-liquid chromatography using a fused silica capillary column (CP-Sil 88, 100 m  $\times$  0.25 mm id, 0.25  $\mu$ m film thickness, Varian, Les Ulis, France) operating under conditions described elsewhere (Bretillon et al., 2007).

### **Prefrontal cortex tissue collection in pups.**

At PND11, male pups were sacrificed either before (n=8-10 per group) or after the 180min-period of MS (n=8 per group). In the basal condition (T0), controls and pups that have been exposed to chronic MS were carefully removed from the home cage, weighted and rapidly sacrificed by decapitation. In the 'stress condition' (T180), chronically separated pups were

normally exposed an additional separation for 180min, after which they were decapitated. Brains were removed and prefrontal cortex (PFC) dissected out according to stereotaxic coordinates (Paxinos et al., 1985), frozen on dry ice and stored at -80°C until gene expression assessment.

**Gene expression in the pups PFC.** Total mRNA was extracted using a TRIzol extraction kit (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration and purity were determined by an ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). One microgram of RNA was reverse transcribed to synthesize cDNA using Superscript III (Invitrogen, Life Technologies) as previously described (Labrousse et al., 2012). Samples were incubated at 25°C for 5min, 42°C for 42min and 70°C for 15min in a programmable thermocycler. Expression of mRNA were measured by qPCR using SYBR® assay (Eurogentec, Seraing, Belgium). The primers sequences used for the detection of Rest, Rest4 and Adcy5 were originally designed by Uchida and colleagues (Uchida et al., 2010) and the others were designed with Primer Express Software. All primers used (**Supplemental Table 1**) were validated for selectivity and amplification efficiency. The real time PCR was performed using the LightCycler 480 system (LC480, Roche diagnostics, Mannheim, Germany) from a mix containing 5µl of cDNA (0.5ng/µl), 10µl of Mesagreen QPCR MasterMix Low ROX (Eurogentec, Saraing, Belgium) and 2µl of the primers mix at optimal concentration in a total volume of 20µl. PCR program consisted of the following steps: 15 min at 95°C, 45 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at 60°C. All samples were performed in duplicates. Target gene expression was normalized to the housekeeping gene *beta-2 microglobulin* ( $\beta 2m$ ). Basal normalized expression (T0) was expressed relative to expression in the control group (control pups of standard-fed dams) while separation-induced expression (T180) was expressed relative to the corresponding expression at T0. In the basal condition, one pup was considered as an outlier and thus excluded from the analysis for all target genes studied. Furthermore, in the gene expression of 5HT<sub>1A</sub> analysis, one pup was excluded from the analysis.

### **Food consumption of stressed dams**

In stressed dams, food intake during the 180min-separation and out of the stress-sessions in the home cage were measured throughout the two weeks of separation. Total 24hr-intake in stressed dams resulted from the addition of “stress” and “out of stress” food intakes and expressed as mean daily intake over the two weeks. Energy ingested was then calculated by

multiplying the amount of food consumed (g) by the energy content (kcal/g). Food intakes on the days of blood collection (postpartum day2 and11) were excluded from the analysis.

#### **Blood samples for corticosterone measurements in dams.**

At postpartum (PP) day 2 and 11, blood samples from stressed dams were withdrawn at the beginning of the separation (baseline), after 60min and at the end of the 180min of separation. Blood was centrifuged at 4°C and plasma was stored at -20°C until corticosterone measurements.

#### **Anxiety-like behavior in stressed dams**

On the last day of the MS procedure, stressed dams fed a SD (n=14) or HFD (n=13) were tested in the light-dark box paradigm. The apparatus consisted in a dark compartment and a light compartment connected by a small opening enabling transition between the two boxes. The total duration spent in the light compartment was recorded for 10min. Two dams were considered as outliers and were excluded from the analysis.

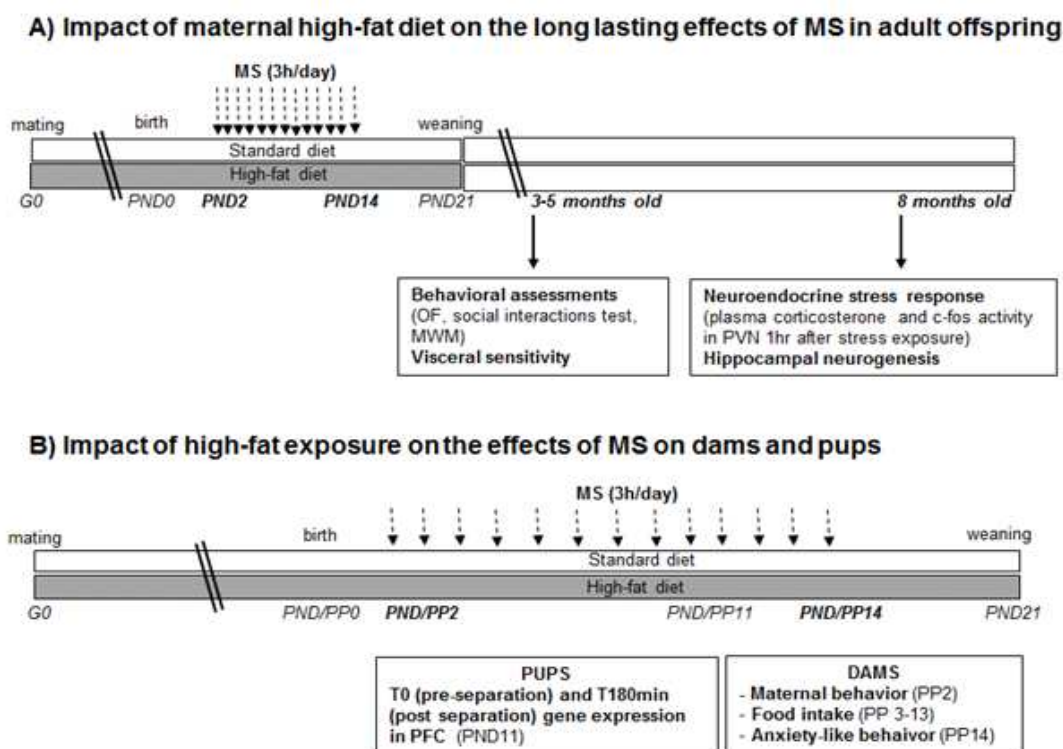
#### **Maternal behavior**

On the first day of MS (PP2), five 60-min periods in the light (13.00, 19.00h) and dark (22.00, 01.00, 05.00h) phases were video-recorded. Using an ethological keyboard, dams' behaviors were scored every 5min (12 observations per hour) and classified into either "maternal behavior" (active nursing, passive nursing, licking/grooming, nesting, pups retrieval) or "non-maternal behavior" (activity out of the nest, eating/drinking, self-grooming). The results were expressed in percentage calculated by dividing the number of maternal behaviors by the total of behaviors scored (n=4 SD dams and n=5 HF dams).

#### **Statistical analysis**

Values are expressed as means  $\pm$  SEM. All data were analyzed using Statistica 6.0. Normality was assessed by using Shapiro–Wilk tests. Data were analyzed by two-way ANOVA associated with Fisher's LSD post hoc when the interaction between maternal diet and maternal separation was significant. Social interaction test and neurogenesis was analyzed using the non-parametric Kruskal Wallis, followed by U Mann Whitney tests for multiple testing. Difference between groups in visceral sensitivity were analyzed with ANOVA for repeated measures with MS and maternal diet as between-subject factors and distension volume as within-subject factor. Spatial learning was tested using ANOVA for repeated

measures with MS and maternal diet as between-subject factors and day of training as within-subject factor. Statistical analysis of the spatial memory performance in the probe test was done using one-way ANOVA with repeated measure on the within-subject factor time spent in quadrant, followed by multiple comparison Fisher's LSD Post hoc tests. The stress-induced gene expression changes in both SD and HF pups compared to baseline expression were analyzed using Student t tests by comparing to a theoretical value equal to 1 (*i.e* corresponding to basal level of expression) or comparing the two groups (SD vs. HF). Food intake of stressed dams over the two weeks of separation was analyzed using ANOVA for repeated measures with diet as between-subject factor and days of MS as within-subject factor. One-sample Student t tests were used to compare milk composition, total daily food intake, maternal behavior and anxiety-like behavior in stressed dams. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .



**Figure 1. Time line representation of the experimental designs to analyze the impact of maternal high-fat diet on the long lasting effects of maternal separation (MS) (A) and the effects of high-fat diet in stressed dams and pups (B).** Dams were fed a standard diet (12% kcal fat) or a high-fat diet (39%kcal fat) during gestation and lactation. Pups underwent maternal separation, 3h/day between PND2 and PND14. In adulthood, male offspring was tested in the open field and social interaction tests for anxiety-like behavior and in the Morris water maze for spatial memory. Visceral sensitivity was evaluated using colorectal distension. At 8months, rats were exposed to an acute-open field exposure and sacrificed after 1hr of recovery in the home cage. Immunohistochemistry analyses for c-fos in the PVN and DCX in the hippocampus were performed. In the second experiment, male pups were sacrificed at PND11 either before or after an additional 180-min separation. Food intake during the 180-min separations and out-of the stress sessions over the two weeks of MS, anxiety-like behavior and maternal behavior were evaluated in stressed dams fed a standard or a high-fat diet.

## RESULTS

### **Maternal high-fat diet (HFD) and maternal separation (MS) modified offspring body weight in adulthood**

A significant interaction between MS and maternal diet was observed for body weight of adult offspring ( $F_{1,55}=6.05$ ,  $p=0.02$ ). MS decreased body weight in offspring of SD dams ( $p=0.04$ ). This body weight reduction was not observed in MS offspring of HFD dams. Maternal HFD did not induce any change in adults' body weight in controls not exposed to stress ( $p=0.48$ ).

### **Maternal high-fat diet alleviated the long lasting behavioral impairments and visceral sensitivity in adult offspring.**

In the social interaction test, there was no main effect or interaction for the time spent in social interaction over the 10min of the test (data not shown). However, the analysis of the first minute which is probably the most anxiogenic for the animals revealed a significant group effect (Kruskal Wallis,  $\chi^2=14.28$ ,  $df=3$ ,  $p=0.002$ ) (**Figure 2A**). MS group exposed to a maternal SD spent significantly less time in social interaction compared to their control counterparts ( $Z=3.13$ ,  $p=0.002$ ). However, there was no significant difference in social interaction between control and MS offspring born to HFD dams ( $Z=0.32$ ,  $p=0.75$ ).

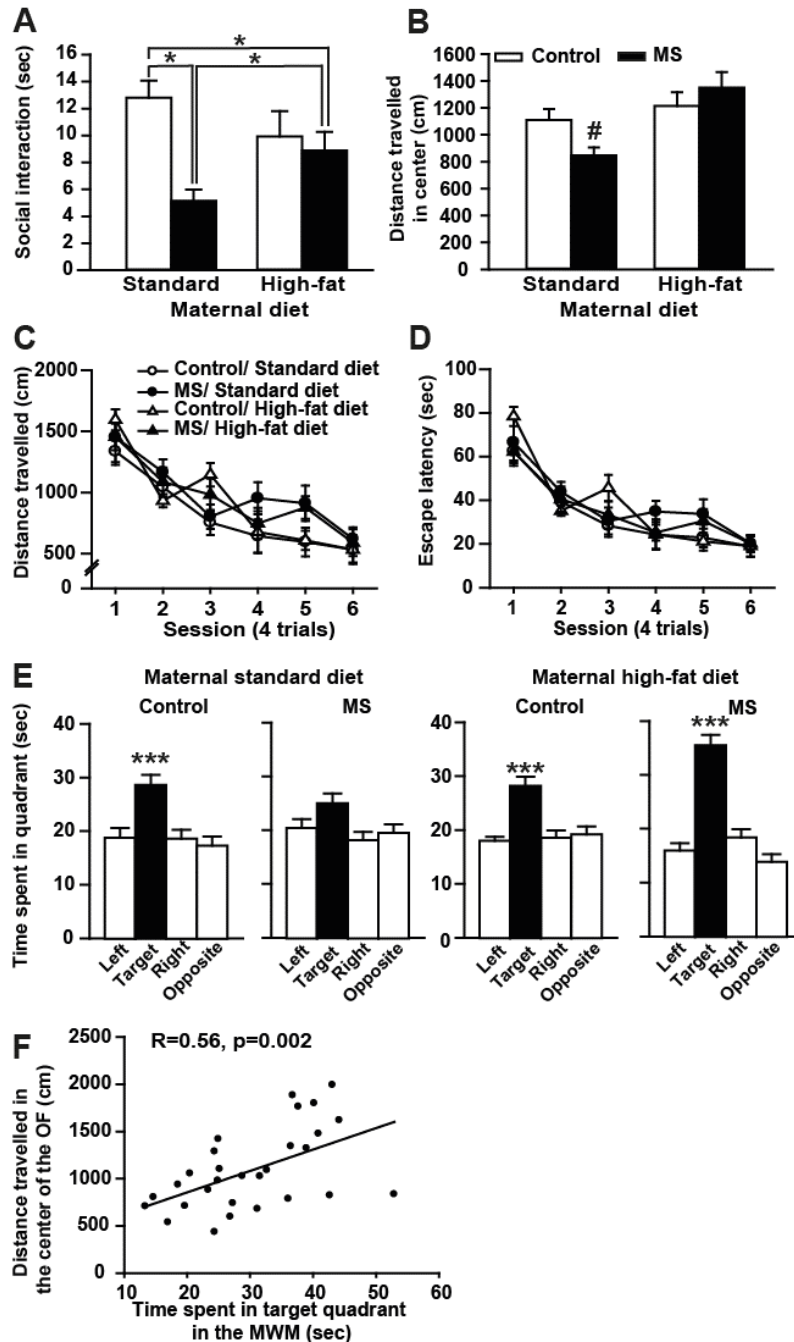
In the open field test (**Figure 2B**), a significant interaction between MS and maternal diet was found for the distance travelled in the center ( $F_{1,54}=4.73$ ,  $p=0.03$ ). MS explored significantly less the center of the open field compared to control groups (Fisher LSD's post hoc, at least  $p<0.05$ ). This difference was abolished in stressed animals exposed to maternal HFD.

In the water maze task, the distance travelled (**Figure 2C**) and the latency (**Figure 2D**) to reach the hidden platform decreased over the training sessions, showing an improvement of spatial learning (respectively  $F_{5,280}=70.93$ ,  $p<0.001$  and  $F_{5,280}=87.08$ ,  $p<0.001$ ). There was no impact of maternal diet or MS on learning performance. As shown in **Figure 2E**, when tested for retention 48hr later, control rats born to SD or HFD dams spent significantly more time in the target quadrant compared to other quadrants (respectively  $F_{3,42}=2.22$ ,  $p=0.01$ ; Fisher LSD post hoc,  $p<0.01$  and  $F_{3,42}=8.15$ ,  $p=0.0002$ ,  $p<0.001$ ). Adult offspring of SD dams exposed to MS during early life did not show any preference for the target quadrant, which highlighted spatial memory deficits in these animals ( $F_{3,42}=2.22$ ,  $p=0.10$ ). However, adult MS offspring

of HFD dams did not have any memory deficit ( $F_{3,42}=25.98$ ,  $p<0.001$ ). Thus, maternal HFD restored the spatial memory performances in MS rats.

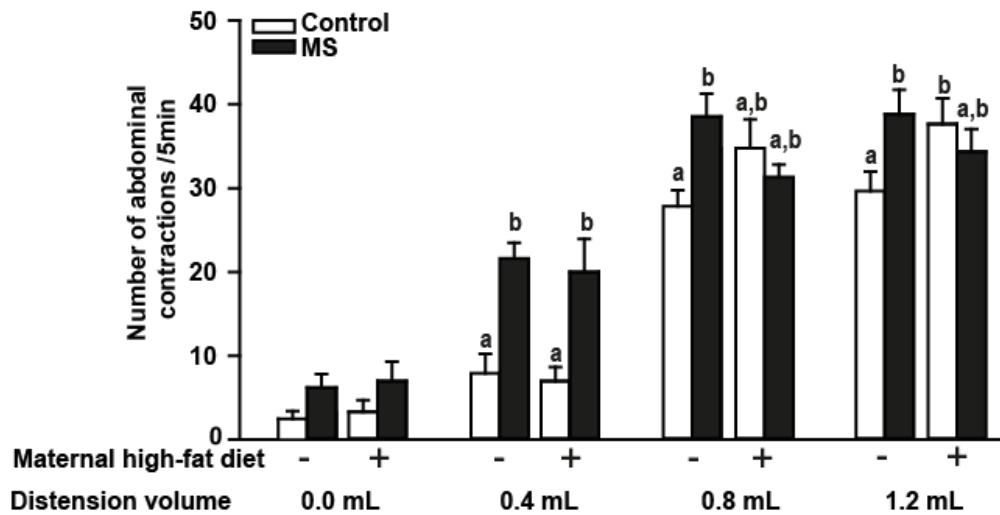
As shown in **Figure 2F**, there was a significant positive correlation between distance travelled in the center of the open-field and time spent in target quadrant in the water maze ( $R=0.56$ ,  $p=0.002$ ) in MS group. Indeed, animals that are the most anxious also exhibit the lowest spatial memory performances during the probe test.

Colorectal distension induced a visceromotor response resulting in abdominal muscles contractions. Quantification of the magnitude of these contractions was used to evaluate visceral sensitivity to pain (Ness and Gebhart, 1988). As shown in **Figure 3**, gradual colorectal distension increased the number of abdominal contractions in a volume-dependent manner ( $F_{3,105}=176.97$ ,  $p<0.001$ , Fisher's LSD post hoc at least  $p<0.001$ ). The ANOVA for repeated measures revealed a significant volume  $\times$  maternal diet  $\times$  MS interaction ( $F_{3,105}=2.85$ ,  $p=0.04$ ). A distension of 0.4mL did not change the magnitude of abdominal contractions compared to baseline in controls of SD ( $p=0.06$ ) and HFD dams ( $p=0.26$ ), indicating that this colorectal distension was not noxious. However, there was a significant increase in the number of abdominal contractions for a distension of 0.4mL as compared to baseline in MS offspring whatever the maternal diet, indicating a reduced threshold to pain. In controls, maternal HFD did not have any impact on abdominal contractions at baseline and in response to the non-nociceptive colorectal distension of 0.4 mL (*vs.* SD controls, respectively  $p=0.34$  and  $p=0.82$ ), but tended to increase it for a volume of 0.8mL ( $p=0.08$ ) and significantly increased it for the distension volume of 1.2mL ( $p=0.05$ ). Offspring of SD dams exposed to MS showed similar abdominal contractions at baseline but enhanced magnitude of abdominal responses to colorectal distension compared to their control counterparts (0.4 mL,  $p=0.001$ ; 0.8 mL,  $p=0.009$  and 1.2 mL,  $p=0.02$ ). In offspring of HFD dams, MS did not change the number of abdominal contractions at baseline ( $p=0.26$ ) but increased the number of abdominal contractions for the non-nociceptive distension volume of 0.4mL ( $p=0.003$ ). However, for the highest volume of 0.8 and 1.2mL MS offspring exposed to maternal HFD showed intermediate profile, as their abdominal response to colorectal distension was similar to controls (respectively  $p=0.38$  and  $p=0.24$ ) and MS offspring of SD dams (respectively  $p=0.08$  and  $p=0.28$ ).



**Figure 2. Maternal high-fat diet protected against long-term behavioral deficits induced by maternal separation.** Time spent in social interaction (sec) (A), distance travelled in the center of the open field (cm) (B), distance travelled (C) and latency (D) to reach the hidden platform during learning, time spent in target quadrant during the retention test (sec), 48hr the last training session (E) and correlation between distance travelled in the center of the open field (OF) and time spent in target quadrant in the Morris water maze (MWM) in adult maternally separated rats (F). Data are means  $\pm$  SEM. MS decreased the time spent in social interaction in offspring born to standard-fed dams. However, there was no difference between controls and MS offspring born to high fat-fed dams. In the open field test, MS reduced the exploration of the center only in offspring of standard-fed dams. During learning, there was no difference between groups over the 6 days of training. In the retention test, 48h after the last training session, controls and MS offspring of high fat-fed dams spent significantly more time in the target quadrant compared to others. However, MS offspring of standard-fed dams did not discriminate the target quadrant, which suggests spatial memory impairments. A negative correlation was found between anxiety-like behavior in the OF and spatial memory performance in the MWM in adult offspring exposed to MS. \*  $p<0.05$ , #  $p<0.05$  vs all other groups and \*\*\*  $p<0.001$  vs other quadrants.





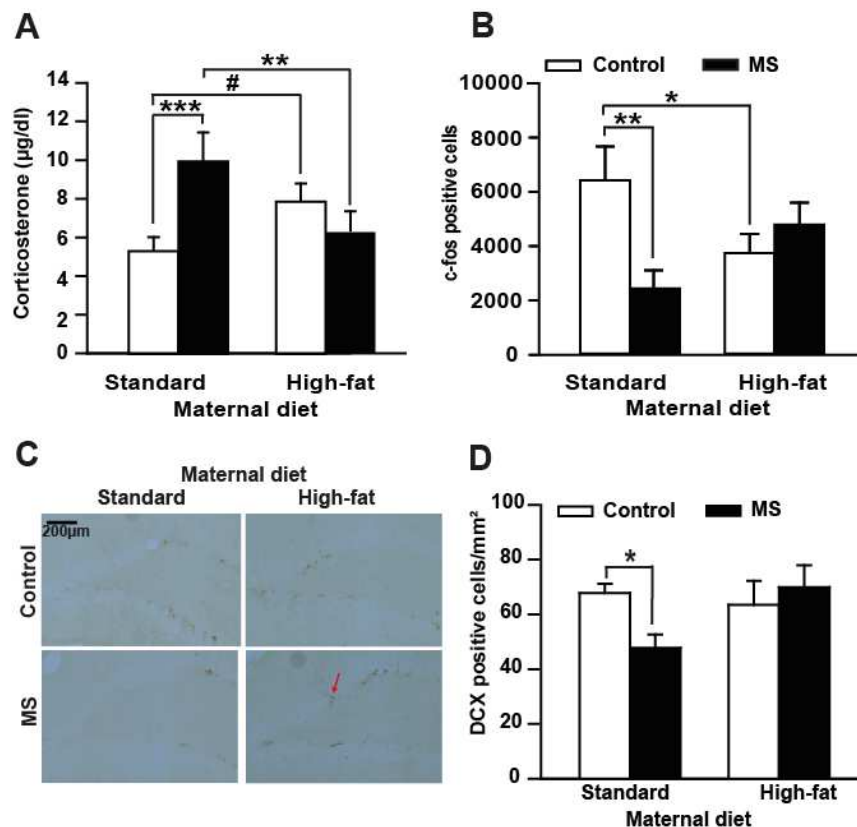
**Figure 3. Maternal high-fat diet partially restored visceral hypersensitivity in maternally separated adult rats.** Number of abdominal contractions (number/5min) in response to gradual volume of distension. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. There was no difference in basal abdominal contractions between groups. At the lowest volume (*i.e.* 0.4mL), MS increased the number of contractions, whether they were exposed to standard or maternal high-fat diet. For the nociceptive volumes (*i.e.* 0.8 and 1.2mL), MS offspring of standard-fed dams still exhibited a higher number of contractions compared to their control counterpart. However, exposure to maternal high-fat diet attenuated this upregulation of abdominal contractions in response to colorectal distension induced by MS. Indeed, MS offspring born to high fat-fed dams presented intermediate profile, as they were neither significantly different of standard MS offspring nor controls. However, maternal high-fat diet in control offspring tended to produce visceral hypersensitivity similar to the one observed in MS offspring, especially for the greatest volume of 1.2mL. Values with different subscript are significantly different (at least  $p < 0.05$ )

## Maternal high-fat diet ameliorated stress response alterations and neurogenesis impairments induced by maternal separation

There was a significant interaction between MS and maternal diet for plasma corticosterone after stress ( $F_{1,55}=9.83$ ,  $p=0.003$ ). MS offspring of SD dams exhibited significant higher corticosterone levels compared to controls ( $p=0.001$ ). In contrast, MS offspring of HFD dams showed normalized corticosterone level ( $p=0.50$ ). Interestingly, maternal HFD *per se* produced similar effects to MS. Indeed, corticosterone levels in control offspring of HFD dams were similar to MS offspring of SD dams ( $p=0.15$ ) (**Figure 4A**).

To further examine the impact maternal HFD on neuroendocrine stress response in MS rats, we stereologically counted c-fos immunoreactive (IR)-cells in the PVN (**Figure 4B**). MS or maternal diet alone did not have any effect of the number of c-fos-IR cells in the PVN (respectively,  $F_{1,27}=2.69$ ,  $p=0.11$  and  $F_{1,27}=0.03$ ,  $p=0.85$ ). However, there were differential effects of MS depending on the maternal diet (MS x maternal diet,  $F_{1,27}=7.94$ ,  $p=0.008$ ). Indeed, MS significantly decreased the number of c-fos-IR cells in the PVN of offspring of SD dams (SD-control vs. SD- MS,  $p=0.03$ ). This effect was suppressed in MS offspring of HFD dams ( $p=0.42$ ). In contrast, maternal HFD *per se* produced similar effect than MS on c-fos activation (SD control vs. HFD control,  $p=0.04$ ).

Neurogenesis analysis showed a significant main effect of group (Kruskal-Wallis,  $\chi^2=8.00$ ,  $df=3$ ,  $p=0.04$ ) (**Figure 4D**). MS decreased the total number of doublecortin (DCX)-positive cells in the dentate gyrus of the hippocampus (U Mann-Whitney,  $Z=2.32$ ,  $p=0.03$ ). However, the MS-induced decrease of newborn neurons was not observed in MS offspring of HFD dams ( $Z=0.58$ ,  $p=0.69$ ). The analysis separating the dorsal and ventral portions of the hippocampus did not revealed any distinction in the effect observed (dorso-ventral axis x MS,  $F_{1,12}=1.98$ ,  $p=0.34$ ), showing that MS did not differentially affect dorsal and ventral neurogenesis.



**Figure 4. Maternal high-fat diet counteracted neuroendocrine dysfunctions following stress exposure and hippocampal neurogenesis impairments induced by maternal separation (MS).** Corticosterone level (µg/dl) (A) and number of c-fos-immunoreactive (IR) cells in the paraventricular nucleus (PVN) 1hr after exposure to stress (B), coronal sections of representative DCX immunostaining within the dentate gyrus (DG) in the different groups (C) and number of DCX-IR cells in the DG (cells/mm<sup>2</sup>). Scale bar: 200µm. Data are means ± SEM. Adult offspring of standard-fed dams submitted to MS exhibited higher corticosterone and fewer c-fos-IR cells in the PVN compared to their control counterpart. Maternal high-fat diet normalized corticosterone levels and c-fos activity in the PVN of MS offspring. Control offspring of high fat-fed dams tended to present neuroendocrine alterations similar to those reported in MS standard offspring (*i.e* increased corticosterone and reduced c-fos-IR cells in the PVN). While MS reduced the number of newborn neurons in the DG in offspring born to standard-fed dams, it did not have any impact on offspring born to high fat-fed dams. #  $p=0.06$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  and \*\*\*  $p<0.001$ .

**Table 1: Milk fat content and fatty acids composition in the stomach of 8-day-old pups born to standard and high fat-fed dams**

	Standard	High-fat
Fat content (% of dry matter)	75,7 ± 2,3	77,2 ± 1,5
Saturated FAs	61,4 ± 0,9	51,7 ± 0,6***
Monounsaturated FAs	32,7 ± 0,8	38,4 ± 0,6***
Polyunsaturated FAs	5,9 ± 0,2	10,0 ± 0,1***
n-6 PUFAs	5,1 ± 0,2	9,5 ± 0,1***
n-3 PUFAs	0,7 ± 0,0	0,4 ± 0,0***

Values are expressed in percent of total fatty acids (mean ± SEM). FAs, Fatty Acids. Student t test, \*\*\*  $p<0.001$

### **Maternal high-fat diet modified lipids content in the milk**

Maternal diet did not affect total fat content of the milk ( $t=0.56$ ,  $p=0.58$ ). However, maternal HFD decreased saturated fatty acids (FAs) ( $t=8.77$ ,  $p<0.001$ ) and increased monounsaturated FAs and PUFAs in stomach fat content of suckling pups (respectively  $t=5.84$  and  $t=17.99$ , both  $p<0.001$ ). In addition, milk fat content of HF pups contained higher amount of n-6 PUFAs ( $t=20.29$ ,  $p<0.001$ ) and lower amount in n-3 PUFAs ( $t=16.76$ ,  $p<0.001$ ) compared to SD pups ( $p<0.001$ ) (**Table 1**).

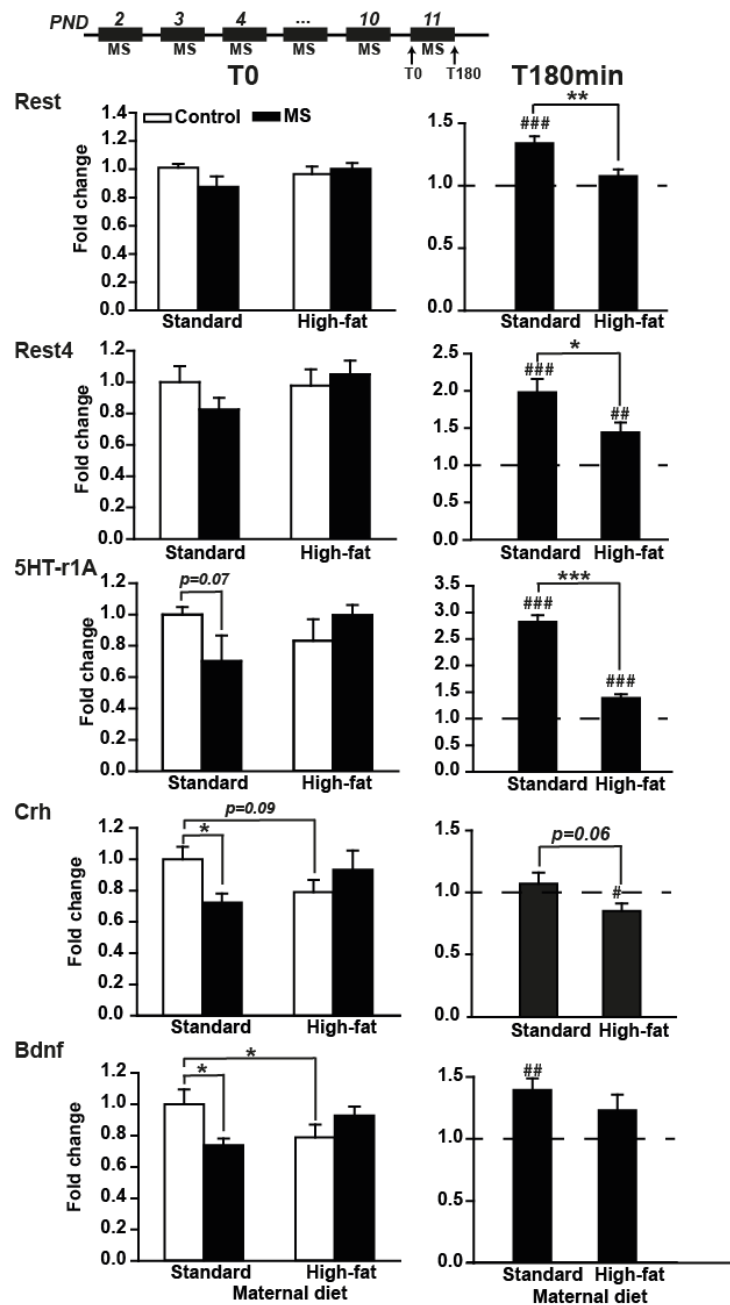
### **Maternal high-fat diet protected pups against gene expression alterations in the prefrontal cortex (PFC) following maternal separation**

Basal gene expression in 11-day-old pups exposed to chronic MS is shown in **Figure5 (left panel)**. Neither MS nor maternal HFD affected basal expression of REST (maternal diet,  $F_{1,32}=0.98$ ,  $p=0.33$ , MS,  $F_{1,32}=0.71$ ,  $p=0.40$  and MS x maternal diet,  $F_{1,32}=3.00$ ,  $p=0.09$ ) or REST4 (maternal diet,  $F_{1,32}=1.09$ ,  $p=0.30$ , MS,  $F_{1,32}=0.28$ ,  $p=0.60$  and MS x maternal diet,  $F_{1,32}=1.62$ ,  $p=0.21$ ). However, significant interactions were found for mRNA levels of BDNF, CRH and 5HT $\alpha$ 1A (respectively,  $F_{1,32}= 6.64$ ,  $p=0.01$ ;  $F_{1,32}= 5.35$ ,  $p=0.03$  and  $F_{1,31}= 4.32$ ,  $p=0.04$ ). Indeed, pups of SD dams exposed to chronic MS elicited downregulated basal expression of BDNF and CRH in the PFC (at least  $p<0.05$ ). There was also a trend toward a decrease in 5HT $\alpha$ 1A mRNA levels ( $p=0.07$ ). Maternal HFD alone and MS produced similar gene expression profile for some of the markers studied. Indeed, the expression of BDNF was downregulated in control offspring born to HFD dams ( $p=0.04$ ) and a trend toward a reduction of CRH expression ( $p=0.09$ ) was also observed. The expression of markers affected by MS was restored by maternal HFD exposure.

In order to study gene expression changes during separation session, we also examined gene expression changes after 180 min of maternal stress in PND11 pups (**Figure5, right panel**). In animals exposed to maternal SD, Rest and Rest 4 mRNA levels were increased by 180 min of MS compared to baseline expression ( $p<0.001$ ). However, the upregulation of REST and REST4 expression following the separation was strongly attenuated in MS pups exposed to HFD (respectively,  $t_{14}=2.45$ ,  $p=0.005$  and  $t_{14}=2.45$ ,  $p=0.03$ ). In addition, the level of 5HT $\alpha$ 1A mRNA was upregulated after 180min of MS in both SD and HFD pups (respectively,

$t_8=14.47$ ,  $p<0.001$  and  $t_8=5.67$ ,  $p<0.001$ ). However, the separation-induced upregulation was greater in SD pups compared to HF pups ( $t_{14}=9.95$ ,  $p<0.001$ ). BDNF mRNA increased compared to baseline level in SD pups ( $t_8=4.24$ ,  $p=0.003$ ) but not in HF pups ( $t_8=1.79$ ,  $p=0.12$ ). However, no significant difference was found between the two groups ( $t_{14}=1.05$ ,  $p=0.31$ ). During separation CRH mRNA levels did not change in SD pups ( $t_8=0.85$ ,  $p=0.42$ ) but slightly decreased it in HFD pups ( $t_8=2.44$ ,  $p=0.04$ ).

After chronic maternal separation, no significant differences between groups were found in the basal expression of other markers in the PFC of 11-day old pups (**Supplementary Figure 1**). However, the 180-min separation increased ADCY5 and NGF mRNA (at least  $p < 0.01$ ), but this effect was not observed in pups exposed to maternal HFD.



**Figure 5. Maternal high-fat diet protects pups against gene expression changes induced by maternal separation (MS).** Gene expression of RE-1 silencing transcription factor (Rest), RE-1 silencing transcription factor splice variant 4 (Rest4), Serotonin receptor 1A (5HT-r1A), Corticotrophin-releasing hormone (Crh) and Brain derived neurotrophic factor (Bdnf) in the prefrontal cortex of 11-day-old pups either before (pre-separation) or after an additional 3hr-separation (post separation). Chronic MS did not have any impact on basal mRNA levels of REST or REST4. However, chronic MS decreased basal mRNA levels of BDNF, CRH and tended to decrease 5HT-r1A mRNA levels ( $p=0.07$ ) in the prefrontal cortex (PFC) of pups of standard-fed dams compared to their control counterpart. Maternal high-fat diet normalized the expression of these markers. Control pups of high fat-fed dams displayed gene expression alterations similar to those observed in pups exposed to MS. After the acute separation at PND11, mRNA levels of REST, REST4, 5HT-r1A and BDNF increased compared to baseline in pups of standard-fed dams. However, the acute separation-induced upregulations of BDNF and REST mRNA were not found in pups of high fat-fed dams. Moreover, the acute separation-induced rises in REST, REST4 and 5HT-r1A were blunted in pups born to high fat-fed dams. While the acute separation did not modify CRH mRNA levels in pups of standard dams, high fat-fed pups displayed a reduction of CRH expression compared to baseline levels. #  $p<0.05$ , ##  $p<0.01$ , ###  $p<0.001$  compared to the standard value of 1 corresponding to the baseline expression before the separation. \*  $p<0.05$  and \*\*\*  $p<0.001$ .

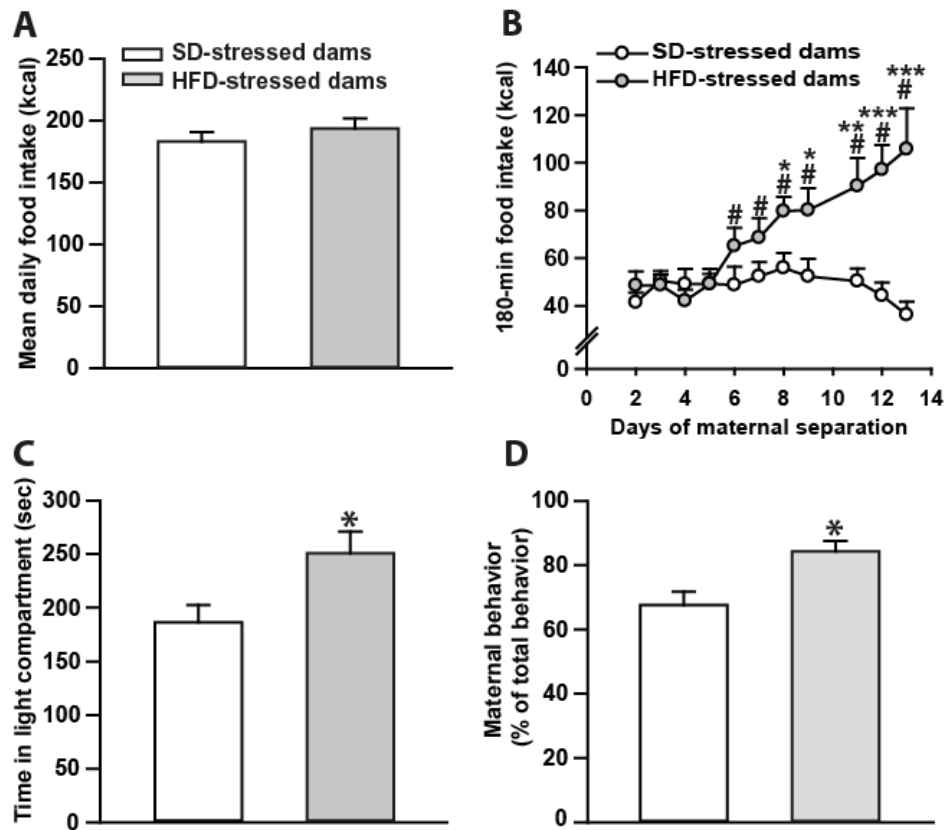
### **High-fat consumption dampened anxiety-like behavior and increased maternal care towards pups in stressed dams.**

We examined corticosterone levels in response to separation in stressed dams at the first (PP2) and at the 10<sup>th</sup> separation (PP11) (Supplementary **Table 2**). On the first separation, corticosterone levels increased over time ( $F_{2,50}=79.52$ ,  $p<0.001$ ) but no significant difference was found between HFD and SD stressed dams ( $F_{1,25}=0.01$ ,  $p=0.91$ ). At PP11, stressed dams fed a high-fat diet exhibited higher basal corticosterone compared to their standard counterparts ( $F_{1,36}=3.96$ ,  $p=0.05$ ).

The mean daily energy intake during the two weeks of MS was similar between SD and HFD dams ( $t_{25}=0.93$ ,  $p=0.36$ ) (**Figure 6A**). Food intake during the 180-min MS sessions increased over the two weeks ( $F_{10,250}=9.10$ ,  $p<0.001$ ) (**Figure 6B**). Overall, HFD dams diet consumed higher amount of energy during the stress of separation compared to SD dams ( $F_{1,25}=9.06$ ,  $p=0.006$ ). An interaction between diet and time was found ( $F_{10,250}=6.98$ ,  $p<0.001$ ). Stressed HFD dams showed a significant higher energy intake compared to stressed SD dams from the 8<sup>th</sup> session of MS.

On the last day of separation from pups, there was a significant reduction of anxiety-like behavior in stressed dams fed a HFD (**Figure 6C**). Indeed, stressed HFD dams spent more time in the light compartment of the dark-light box compared to stressed SD dams ( $t_{23}=2.53$ ,  $p=0.02$ ).

Analysis of maternal behavior revealed that stressed dams under HFD displayed increased maternal care towards their pups (U Mann Whitney,  $Z=2.20$ ,  $p=0.03$ ; **Figure 6D**). This enhanced maternal behavior resulted from an overall increase in the different maternal behaviors studied (*i.e* active and passing nursing, licking-grooming, nesting) as compared to non-maternal behaviors (drinking, eating, sleeping and activity out of the nest).



**Figure 6: Impact of high-fat consumption on stressed dams exposed to maternal separation.** Mean daily food intake (in kcal) (**A**), food intake (in kcal) during the 180-min separations (**B**) over the two weeks of the maternal separation procedure, anxiety-like behavior in the dark/light box assessed on the last day of maternal separation (PP14) (**C**) and maternal behavior expressed as percentage of total behaviors measured on the first day of maternal separation (**D**). Daily food intake was not different between standard and high fat-fed dams. However, stressed dams fed a high-fat diet increased their food intake during the 180min of separation from pups over the two weeks of MS and consumed significantly more food compared to standard-fed stressed dams. In addition, dams fed a high-fat diet showed a reduction of their anxiety-like behavior and higher maternal care towards their progeny. # at least  $p < 0.05$  compared to MS-day 2, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p = 0.001$  high-fat vs standard.



## DISCUSSION

Over the past years, many studies have demonstrated the relationship between nutrition and stress (Dallman et al., 2003; Torres and Nowson, 2007). Here, we demonstrated that early exposure to high-fat through the dam's diet protected against long lasting disturbances induced by MS on behavior, visceral sensitivity and neuroendocrine stress response. As a potential mechanisms involved in this protective effect, we found that exposure to HFD during the perinatal period counteracted the MS-induced neurodevelopmental alterations in pups' prefrontal cortex. Interestingly, we also reported a reduction of anxiety-like behavior and enhanced maternal behavior in high fat-fed stressed dams, indicating an 'anti-stress' of HFD in dams exposed to MS.

A major finding of the present study is that enhanced anxiety-like behavior, reduced social behavior and spatial memory deficits induced by MS were all alleviated by maternal HFD exposure early in life. A previous study conducted in adult animals has shown that HFD consumption can attenuate the deleterious effects of MS on emotional behaviors (Maniam and Morris, 2010b, c). However, our study is the first to demonstrate that an indirect exposure to HFD through maternal diet during development can counteract the long lasting emotional disturbances induced by early adversity. Since the model of MS is also characterized by cognitive dysfunctions (Aisa et al., 2007), we examined the impact of maternal HFD on spatial memory. MS induced spatial memory deficits that are reversed by early life exposure to HFD. Interestingly, we reported a positive correlation between spatial memory performances and anxiety-like behavior in the open field in the MS group. Given that the water maze task is an aversive task (Sandi et al., 1997), the protective effect of the maternal HFD on spatial memory could be in part mediated by a reduction of their anxiety-like behavior during the probe test without platform. We observed a reduction of DCX labeling in the dentate gyrus of the hippocampus in MS animals suggesting an alteration of neurogenesis. This result is consistent with other studies showing that experiencing early stress leads to neurogenesis impairments in adulthood (Karten et al., 2005; Lajud et al., 2012; Mirescu et al., 2004). In contrast, such alteration is attenuated by maternal HFD. Since hippocampal neurogenesis has been involved in spatial memory and emotions especially anxiety-like behaviours (Cameron and Glover, 2014), it could be hypothesized that the restoration of these functions in MS rats exposed to maternal HFD is in part mediated by the amelioration of hippocampal plasticity in adulthood.

Early life stressors are known to predispose for IBS in adulthood (Chitkara et al., 2008). An important symptom of IBS is visceral hypersensitivity (Azpiroz, 2002; Camilleri et al., 2001). We confirmed here that adult rats exposed to MS exhibited lowered threshold volume perceived as a nociceptive stimulus and exaggerated the visceromotor responses to colorectal distension, indicating a visceral hypersensitivity and hyperalgesia. In contrast, adult rats born to HFD dams that had experienced MS showed attenuated abdominal contractions in response to noxious stimuli. This effect is consistent with a recent study showing that in adult rats palatable food is able to attenuate chronic stress-induced colonic hypermotility (Rho et al., 2014). We also found an increase of abdominal contraction with a painful stimulus (1.2 mL) in rats exposed to maternal HFD alone which suggests hyperalgesia. This result indicates that maternal HFD has opposite consequences in control and early stressed animals.

Hyperactivity to stress and dysregulations of HPA axis are common features of animals experiencing early adversity (Aisa et al., 2007) and has been proposed to participate to the behavioral alterations as well as the higher visceral sensitivity in MS rats (O'Mahony et al., 2011). In accordance with previous results (Huot et al., 2004; Ladd et al., 2000), we showed higher corticosterone levels following an aversive stress in MS offspring compared to their control counterparts. However, MS offspring showed normalized corticosterone levels when they were exposed to HFD early in life. Higher plasma corticosterone was also associated with lower c-fos immunoreactivity in the PVN of MS offspring from SD dams. Interestingly, maternal HFD in control animals led to the same response than MS. In adult subjects, HFD has been shown to either exacerbated or blunted HPA axis response (la Fleur et al., 2005; Legendre and Harris, 2006). Thus, HFD may have distinct effects depending of the environmental challenge. It could be adaptive in a stressful environment and deleterious in a normal condition.

In the second part of the study, we focused on the potential mechanisms underlying the protective effect of maternal HFD. Recent evidence suggests that the long-lasting consequences of MS could be mediated by neurodevelopmental alterations of prefrontal cortex. Indeed, pups exposed to MS exhibited several changes in gene expression in the medial prefrontal cortex (mPFC) and a transient increase in mRNA level of Rest 4 mRNA specifically in the mPFC during the early postnatal period (Uchida et al., 2010). Using viral infection, Uchida et coll. (2010) have demonstrated that the overexpression of Rest 4 in the mPFC in pups but not in adults induced anxiety and depressive behaviors in adulthood. Therefore, we were interested to examine whether maternal HFD could attenuate

neurodevelopmental alterations induced by MS. We measured gene expression in 11-day-old-pups chronically separated. Among the different target genes tested, we demonstrated that chronic MS resulted in downregulated basal expression of *Bdnf* and *Crh* and a tendency towards reduced expression of 5HTr1A in the PFC. Maternal HFD completely normalized these markers in offspring exposed to MS. Several studies have reported lower CRH mRNA in the cortex (Vazquez et al., 2006) of early stressed pups. CRH regulates BDNF expression (Bayatti et al., 2005; Walsh et al., 2014), its alteration could thus participate to the reduced BDNF expression in the prefrontal cortex of MS pups. BDNF *via* its role in the establishment of neuronal connectivity plays a critical role during development (Cohen-Cory et al., 2010; Cunha et al., 2010). BDNF has also a role in serotonin signaling and 5HTr-1A are involved in the regulation of synaptogenesis, neuronal outgrowth and complexity during development (Sikich et al., 1990). We also reported changes in gene expression after 180 min of MS in 11-day-old pups. REST, REST-4, 5HTr-1A and BDNF mRNA levels were elevated following separation. Interestingly, we demonstrated that all of these changes are reversed by maternal HFD. It has been shown that neuronal cells undergoing apoptosis enhanced their synthesis of 5HT1rA mRNA in an attempt to survive (Singh et al., 1996). Thus, we can hypothesized that the blunted upregulation in MS pups exposed to maternal HFD may translate reduced level of cellular insult, and thus a decreased brain sensitivity to stress. Altogether, these results suggest that maternal HFD exposure could attenuate the altered maturation of the PFC through its action on neuroplasticity pathways in stressed pups and protected this area from the separation-related changes such as increased expression of REST and REST4.

MS acts as a highly potent stressor for dams and induces postpartum emotional disturbances (Aguggia et al., 2013; Boccia et al., 2007). Many studies suggest that high-fat feeding can modulate stress response in adulthood (Finger et al., 2011; Krolow et al., 2010). We found that stressed dams fed a HFD showed increased calories intake during the 180-min session of separation compared to stressed SD dams. This stress-induced intake of high-fat is in line with a growing number of studies reporting that stress increases the consumption of palatable food in both human and animals (Epel et al., 2000; Oliver and Wardle, 1999; Pecoraro et al., 2004) Dalman (2003) proposed that stress induces an overconsumption of palatable food, which is thought to dampen negative emotions induced by stress exposure. Accordingly to this hypothesis, we reported that high-fat consumption was associated with a reduction of the anxiety-like behavior in stressed dams at the end of the MS procedure. This result is in line with a previous study showing that long-term postpartum anxiety and depression-like

behavior are ameliorated by palatable high fat diet in mother rats subjected to maternal separation (Maniam and Morris, 2010a). Therefore, we can hypothesize that the overconsumption during stress-sessions observed in dams may be considered as an attempt of “self medication” against deleterious emotional states induced by stress exposure.

In examining maternal behavior, we reported that stressed dams fed a HFD during gestation and lactation increased care towards their pups compared to stressed dams fed a SD, which is consistent with previous studies (Purcell et al., 2011; Rolls et al., 1986). A large body of evidence highlighted the importance of maternal behavior in the later offspring brain function, emotional behavior and HPA response to stress (Meaney, 2001). In our study, maternal HFD produced some deficits in control animals (neuroendocrine response to stress, visceral pain, basal BDNF expression at PND11). However, we did not report any modification of maternal care in control dams fed a high-fat diet (data not shown). Thus, even if enhanced maternal care in stressed dams may be partially involved in the protective effect of maternal HFD against deleterious effects of MS, others processes are probably involved. An important finding that could underlie protective effect of maternal HFD is lipid composition of the milk. We demonstrate that even if maternal HFD contains an important part of lipids (39%), compared to SD (5%), the total amount of lipids was similar in the maternal milk. Furthermore, milk from HFD dams has paradoxically lower levels of saturated fatty acids and higher levels of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. Interestingly, it has been shown that saturated fatty acids consumption, in adult rats, affects brain plasticity and sensitizes to emotional disturbances (Sharma et al., 2012). Thus, it could be hypothesized that the protective effect of maternal HFD on the deleterious effects of MS could be related to the reduced exposure to saturated fatty acids in HFD suckling pups.

## **CONCLUSION**

Despite the massive change in diet habits in modern societies, the impact of maternal diet on later brain function in individuals exposed to early adverse environment is unknown. Here, using an animal model, we demonstrated that exposure to maternal HFD can counteract the deleterious programming effects of early stress on adult emotional behavior and visceral sensitivity. These effects are associated with changes in lipids content of the milk and a restoration of the expression of several markers involved in plasticity and mood regulation in the prefrontal cortex of pups. Finally, maternal HFD intake produces a reduction of anxiety

and enhances maternal care in stressed dams, which could also contribute to the protective effects of maternal HFD in early stressed animals.

## **FUNDING AND DISCLOSURES**

This study was supported by INRA, the University of Bordeaux and Projet inter-région Aquitaine et Midi-Pyrénées. A.L.L. was supported by a stipend of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

**The authors declare no conflict of interest.**

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Mathieu Cadet for taking care of the rats, Alexandra Séré for c-fos counting, and Marine Randé for the light-dark box analysis.

## **SUPPLEMENTARY INFORMATION**

## Supplementary tables

**Supplementary Table 1: Primer pairs used for quantitative RT-PCR analysis**

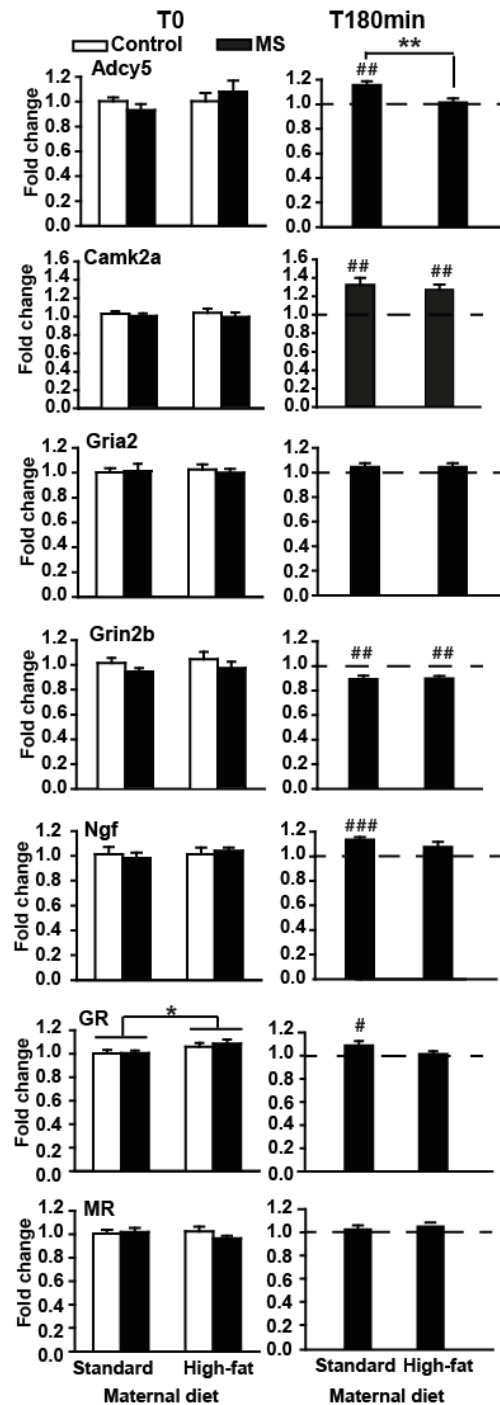
Gene name	Sense primer	Antisense primer
Adcy5	5'-CCGAAAGTTCCTCTTGACCTTTAG -3'	5'-GCACCAAATCGGTCATCCA -3'
B2m	5'- CGTGCTTGCCATTCAGAAAA-3'	5'- GAAGTTGGGCTTCCCATTCTC-3'
Bdnf	5'-GAAGTTGGGCTTCCCATTCTC-3'	5'- AACCATAAGGACGCGGACTTG-3'
Camk2a	5'- GCATCTGCCGCTTGTTGAA -3'	5'-TCCTCGGAGATGCTGTGATG -3'
Crh	5'-CAGCCGTTGAATTTCTTG-3'	5'-GACTTCTGTTGAGGTTCC-3'
Gria2	5'- AGTAAATGACATTGTGGACCAGGTTAT -3'	5'-AGCAGGTCCCCATCAGTGAA -3'
Grin2b	5'-AGCCAGGAGGCCCATCTT -3'	5'- GCACAGGTACGGAGTTGTTAAACAC -3'
HTr1A	5'-GCGTTGTTGGGTGCCATAAT -3'	5'- CCGGATTGAGCAGGGAGTT -3'
Ngf	5'-TACAGGCAGAACCGTACACAGATAG -3'	5'- CAGTGGGCTTCAGGGACAGA-3'
Nr3c1	5'- GGGACCACCTCCCAAGCT-3'	5'-ACCCCGTAATGACATCCT -3'
Nr3c2	5'- CTTTACGAAGTGTCTTCTACTACTG-3'	5'- TGACACCCAGAAGCCTCATCT-3'
Rest	5'-GCGGTTTGTGAAATGGAAGT -3'	5'-CAGGGTCCACTCTTGGGTTA-3'
Rest4	5'-CGTGCTTGCCATTCAGAAAA -3'	5'- GAAGTTGGGCTTCCCATTCTC-3'

Adcy5, Adenylate cyclase5; B2m,  $\beta$ 2-microglobulin; Bdnf, Brain-derived neurotrophic factor; Camk2a, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2  $\alpha$ ; Gria2, Glutamate receptor, ionotropic, AMPA2; Grin2b, Glutamate receptor, N-methyl D-aspartate 2B; HTr1A, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A; Ngf, Nerve growth factor, Nr3c1, Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (GR); Nr3c2, Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2 (MR); Rest, RE1-silencing transcription factor; Rest4, RE1-silencing transcription factor splicing variant 4.

**Supplementary Table 2: Plasma corticosterone levels ( $\mu$ g/dl) in stressed dams fed a SD or a HFD on the first day of maternal separation and after 10days of chronic maternal separation.**

	1st separation (PP2)		10th separation (PP11)	
	Standard diet	High-fat diet	Standard diet	High-fat diet
0 min (basal)	10.5 $\pm$ 1.5	7.8 $\pm$ 1.3	11.9 $\pm$ 1.7	17.5 $\pm$ 1.6*
60 min post separation	31.6 $\pm$ 2.0	32.5 $\pm$ 2.8	19.0 $\pm$ 1.1	20.6 $\pm$ 1.9
180 min post separation	15.8 $\pm$ 1.0	17.0 $\pm$ 1.0	14.4 $\pm$ 2.1	12.9 $\pm$ 1.4

Values are expressed as means  $\pm$  SEM. PP: Post Partum. \*  $p < 0.05$  vs standard diet at PP11.



**Supplementary Figure 1: Maternal high-fat diet modulates gene expression changes induced by maternal separation (MS).** mRNA levels of CAMK2a, ACDY5, GRIN2B, GRIA2, NGF GR and MR in the prefrontal cortex of 11-day-old pups either before separation (pre –separation) or after an additional 180-min separation (post separation). Camk2a, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2  $\alpha$ ; Adcy5, Adenylate cyclase5; Grin2b, Glutamate receptor, N-methyl D-aspartate 2B; Gria2, Glutamate receptor, ionotropic, AMPA2; GR, glucocorticoids receptor; MR, mineralocorticoids receptor; Ngf, Nerve growth factor. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Pups born to high fat-fed dams exhibited a greater basal mRNA levels of GR, whether they were stressed or not (MS, n.s; maternal diet,  $p < 0.05$  and MS  $\times$  maternal diet, n.s). The expression of NGF and CAMK2a increased and the expression of GRIN2B decreased, after the additional separation but no difference between groups was found. However, the upregulation of ADCY5 mRNA level induced by the additional separation was blunted in pups born to high fat-fed dams. Moreover, only standard pups presented an elevation of mRNA levels of GR after the additional separation. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  compared to a standard value of 1 representing mRNA levels before the separation. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

## REFERENCES

- Aguggia, J.P., Suarez, M.M., Rivarola, M.A., 2013. Early maternal separation: neurobehavioral consequences in mother rats. *Behav Brain Res* 248, 25-31.
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., Ramirez, M.J., 2007. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32, 256-266.
- Ait-Belgnaoui, A., Bradesi, S., Fioramonti, J., Theodorou, V., Bueno, L., 2005. Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* 113, 141-147.
- Azpiroz, F., 2002. Hypersensitivity in functional gastrointestinal disorders. *Gut* 51 Suppl 1, i25-28.
- Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J., Bueno, L., 2007. New insights in the etiology and pathophysiology of irritable bowel syndrome: contribution of neonatal stress models. *Pediatr Res* 62, 240-245.
- Bayatti, N., Hermann, H., Lutz, B., Behl, C., 2005. Corticotropin-releasing hormone-mediated induction of intracellular signaling pathways and brain-derived neurotrophic factor expression is inhibited by the activation of the endocannabinoid system. *Endocrinology* 146, 1205-1213.
- Boccia, M.L., Razzoli, M., Vadlamudi, S.P., Trumbull, W., Caleffie, C., Pedersen, C.A., 2007. Repeated long separations from pups produce depression-like behavior in rat mothers. *Psychoneuroendocrinology* 32, 65-71.
- Bradford, K., Shih, W., Videlock, E.J., Presson, A.P., Naliboff, B.D., Mayer, E.A., Chang, L., 2012. Association between early adverse life events and irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10, 385-390 e381-383.
- Bretillon, L., Diczfalusy, U., Bjorkhem, I., Maire, M.A., Martine, L., Joffre, C., Acar, N., Bron, A., Creuzot-Garcher, C., 2007. Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is specifically expressed in neurons of the neural retina. *Curr Eye Res* 32, 361-366.
- Cameron, H.A., Glover, L.R., 2014. Adult Neurogenesis: Beyond Learning and Memory. *Annu Rev Psychol*.
- Camilleri, M., Coulie, B., Tack, J.F., 2001. Visceral hypersensitivity: facts, speculations, and challenges. *Gut* 48, 125-131.
- Chapman, D.P., Whitfield, C.L., Felitti, V.J., Dube, S.R., Edwards, V.J., Anda, R.F., 2004. Adverse childhood experiences and the risk of depressive disorders in adulthood. *J Affect Disord* 82, 217-225.
- Chitkara, D.K., van Tilburg, M.A., Blois-Martin, N., Whitehead, W.E., 2008. Early life risk factors that contribute to irritable bowel syndrome in adults: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 103, 765-774; quiz 775.
- Cohen-Cory, S., Kidane, A.H., Shirkey, N.J., Marshak, S., 2010. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev Neurobiol* 70, 271-288.
- Cordain, L., Eaton, S.B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B.A., O'Keefe, J.H., Brand-Miller, J., 2005. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 81, 341-354.
- Cunha, C., Brambilla, R., Thomas, K.L., 2010. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 3, 1.
- Dallman, M.F., Pecoraro, N., Akana, S.F., La Fleur, S.E., Gomez, F., Houshyar, H., Bell, M.E., Bhatnagar, S., Laugero, K.D., Manalo, S., 2003. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11696-11701.



- Darnaudey, M., Perez-Martin, M., Del Favero, F., Gomez-Roldan, C., Garcia-Segura, L.M., Maccari, S., 2007. Early motherhood in rats is associated with a modification of hippocampal function. *Psychoneuroendocrinology* 32, 803-812.
- Epel, E.S., McEwen, B., Seeman, T., Matthews, K., Castellazzo, G., Brownell, K.D., Bell, J., Ickovics, J.R., 2000. Stress and body shape: Stress-induced cortisol secretion is consistently greater among women with central fat. *Psychosomatic Medicine* 62, 623-632.
- Finger, B.C., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2011. High-fat diet selectively protects against the effects of chronic social stress in the mouse. *Neuroscience* 192, 351-360.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.
- Francis, D.D., Diorio, J., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 2002. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J Neurosci* 22, 7840-7843.
- Heim, C., Nemeroff, C.B., 2001. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49, 1023-1039.
- Heim, C., Plotsky, P.M., Nemeroff, C.B., 2004. Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. *Neuropsychopharmacology* 29, 641-648.
- Huot, R.L., Gonzalez, M.E., Ladd, C.O., Thirivikraman, K.V., Plotsky, P.M., 2004. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology* 29, 279-289.
- Kalinichev, M., Easterling, K.W., Holtzman, S.G., 2002. Early neonatal experience of Long-Evans rats results in long-lasting changes in reactivity to a novel environment and morphine-induced sensitization and tolerance. *Neuropsychopharmacology* 27, 518-533.
- Karten, Y.J., Olariu, A., Cameron, H.A., 2005. Stress in early life inhibits neurogenesis in adulthood. *Trends Neurosci* 28, 171-172.
- Kearney, J., 2010. Food consumption trends and drivers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 2793-2807.
- Kosten, T.A., Kim, J.J., Lee, H.J., 2012. Early life manipulations alter learning and memory in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 36, 1985-2006.
- Krolow, R., Noschang, C.G., Arcego, D., Andreazza, A.C., Peres, W., Goncalves, C.A., Dalmaz, C., 2010. Consumption of a palatable diet by chronically stressed rats prevents effects on anxiety-like behavior but increases oxidative stress in a sex-specific manner. *Appetite* 55, 108-116.
- la Fleur, S.E., Houshyar, H., Roy, M., Dallman, M.F., 2005. Choice of lard, but not total lard calories, damps adrenocorticotropin responses to restraint. *Endocrinology* 146, 2193-2199.
- Labrousse, V.F., Costes, L., Aubert, A., Darnaudey, M., Ferreira, G., Amedee, T., Laye, S., 2009. Impaired interleukin-1beta and c-Fos expression in the hippocampus is associated with a spatial memory deficit in P2X(7) receptor-deficient mice. *PLoS One* 4, e6006.
- Labrousse, V.F., Nadjar, A., Joffre, C., Costes, L., Aubert, A., Gregoire, S., Bretillon, L., Laye, S., 2012. Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS One* 7, e36861.
- Ladd, C.O., Huot, R.L., Thirivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Meaney, M.J., Plotsky, P.M., 2000. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res* 122, 81-103.
- Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutierrez-Ospina, G., Torner, L., 2012. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology* 37, 410-420.

- Legendre, A., Harris, R.B., 2006. Exaggerated response to mild stress in rats fed high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291, R1288-1294.
- Lemaire, V., Lamarque, S., Le Moal, M., Piazza, P.V., Abrous, D.N., 2006. Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 59, 786-792.
- Maniam, J., Morris, M.J., 2010a. Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet. *Behav Brain Res* 208, 72-79.
- Maniam, J., Morris, M.J., 2010b. Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology* 35, 717-728.
- Maniam, J., Morris, M.J., 2010c. Voluntary exercise and palatable high-fat diet both improve behavioural profile and stress responses in male rats exposed to early life stress: role of hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* 35, 1553-1564.
- Meaney, M.J., 2001. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 24, 1161-1192.
- Millstein, R.A., Holmes, A., 2007. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neurosci Biobehav Rev* 31, 3-17.
- Mirescu, C., Peters, J.D., Gould, E., 2004. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci* 7, 841-846.
- Ness, T.J., Gebhart, G.F., 1988. Colorectal distension as a noxious visceral stimulus: physiologic and pharmacologic characterization of pseudoaffective reflexes in the rat. *Brain Res* 450, 153-169.
- O'Mahony, S.M., Hyland, N.P., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2011. Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 214, 71-88.
- Oliver, G., Wardle, J., 1999. Perceived effects of stress on food choice. *Physiology & Behavior* 66, 511-515.
- Paxinos, G., Watson, C., Pennisi, M., Topple, A., 1985. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods* 13, 139-143.
- Pecoraro, N., Reyes, F., Gomez, F., Bhargava, A., Dallman, M.F., 2004. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145, 3754-3762.
- Purcell, R.H., Sun, B., Pass, L.L., Power, M.L., Moran, T.H., Tamashiro, K.L., 2011. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav* 104, 474-479.
- Rho, S.G., Kim, Y.S., Choi, S.C., Lee, M.Y., 2014. Sweet food improves chronic stress-induced irritable bowel syndrome-like symptoms in rats. *World J Gastroenterol* 20, 2365-2373.
- Richard, E.M., Helbling, J.C., Tridon, C., Desmedt, A., Minni, A.M., Cador, M., Pourtau, L., Konsman, J.P., Mormede, P., Moisan, M.P., 2010. Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* 151, 649-659.
- Rolls, B.A., Gurr, M.I., Vanduijvenvoorde, P.M., Rolls, B.J., Rowe, E.A., 1986. Lactation in Lean and Obese Rats - Effect of Cafeteria Feeding and of Dietary Obesity on Milk-Composition. *Physiology & Behavior* 38, 185-190.
- Rosztoczy, A., Fioramonti, J., Jarmay, K., Barreau, F., Wittmann, T., Bueno, L., 2003. Influence of sex and experimental protocol on the effect of maternal deprivation on rectal sensitivity to distension in the adult rat. *Neurogastroenterol Motil* 15, 679-686.
- Sandi, C., Loscertales, M., Guaza, C., 1997. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur J Neurosci* 9, 637-642.

- Sharma, S., Zhuang, Y., Gomez-Pinilla, F., 2012. High-fat diet transition reduces brain DHA levels associated with altered brain plasticity and behaviour. *Sci Rep* 2, 431.
- Sikich, L., Hickok, J.M., Todd, R.D., 1990. 5-HT<sub>1A</sub> receptors control neurite branching during development. *Brain Res Dev Brain Res* 56, 269-274.
- Singh, J.K., Chromy, B.A., Boyers, M.J., Dawson, G., Banerjee, P., 1996. Induction of the serotonin<sub>1A</sub> receptor in neuronal cells during prolonged stress and degeneration. *J Neurochem* 66, 2361-2372.
- Theodorou, V., 2013. Susceptibility to stress-induced visceral sensitivity: a bad legacy for next generations. *Neurogastroenterol Motil* 25, 927-930.
- Torres, S.J., Nowson, C.A., 2007. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 23, 887-894.
- Uchida, S., Hara, K., Kobayashi, A., Funato, H., Hobara, T., Otsuki, K., Yamagata, H., McEwen, B.S., Watanabe, Y., 2010. Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. *J Neurosci* 30, 15007-15018.
- Uysal, N., Sisman, A.R., Dayi, A., Aksu, I., Cetin, F., Gencoglu, C., Tas, A., Buyuk, E., 2011. Maternal exercise decreases maternal deprivation induced anxiety of pups and correlates to increased prefrontal cortex BDNF and VEGF. *Neurosci Lett* 505, 273-278.
- Vazquez, D.M., Bailey, C., Dent, G.W., Okimoto, D.K., Steffek, A., Lopez, J.F., Levine, S., 2006. Brain corticotropin-releasing hormone (CRH) circuits in the developing rat: effect of maternal deprivation. *Brain Res* 1121, 83-94.
- Vetulani, J., 2013. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacol Rep* 65, 1451-1461.
- Walsh, J.J., Friedman, A.K., Sun, H., Heller, E.A., Ku, S.M., Juarez, B., Burnham, V.L., Mazei-Robison, M.S., Ferguson, D., Golden, S.A., Koo, J.W., Chaudhury, D., Christoffel, D.J., Pomeranz, L., Friedman, J.M., Russo, S.J., Nestler, E.J., Han, M.H., 2014. Stress and CRF gate neural activation of BDNF in the mesolimbic reward pathway. *Nat Neurosci* 17, 27-29.
- Zeeni, N., Daher, C., Fromentin, G., Tome, D., Darcel, N., Chaumontet, C., 2013. A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. *Stress* 16, 211-219.

## **Discussion générale**

## *Discussion générale*

---

Les premières phases de vie constituent des périodes sensibles à l'environnement. Ainsi, des facteurs environnementaux précoces peuvent non seulement influencer sur la trajectoire développementale mais aussi programmer la santé à l'âge adulte. En effet, il est désormais clairement établi que l'adversité pendant l'enfance augmente les risques de développer des troubles neuropsychiatriques et métaboliques à l'âge adulte.

Par ailleurs, l'évolution des habitudes alimentaires indique une augmentation de la consommation d'aliments à forte densité calorique, et riches en lipides. Cependant, les conséquences de ce changement nutritionnel sur le cerveau en développement et sur la vulnérabilité émotionnelle et cognitive à long terme sont peu connues. La plupart des travaux menés aussi bien chez l'homme que dans les modèles animaux ne permettent pas de contrôler les variables confondantes telles que l'obésité maternelle et ne se sont pas intéressés aux effets combinées de facteurs précoces. Ainsi, l'impact d'un environnement nutritionnel hyperlipidique associé à un stress précoce n'est pas connu. Or, on sait qu'il existe des liens étroits entre stress et nutrition.

**Ce travail avait pour but de déterminer, à l'aide d'un modèle animal, l'impact d'un environnement nutritionnel hyperlipidique périnatal sur le phénotype comportemental et métabolique adulte. Par ailleurs, cette étude visait à évaluer l'incidence d'une nutrition maternelle hyperlipidique combinée à un stress précoce sur la programmation du phénotype de la descendance adulte.**

Nous avons montré que l'exposition périnatale à une nutrition hyperlipidique modifie l'expression de certains gènes dans l'hippocampe et affecte des paramètres métaboliques (cholestérol, leptine) chez la descendance adulte. Cependant, le régime maternel hyperlipidique lorsqu'il n'est pas associé à une obésité maternelle n'a pas d'effet sur les processus émotionnels ou sur les capacités mnésiques de la descendance. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que le stress précoce entraîne des altérations du phénotype métabolique à l'âge adulte, qui se manifestent par une prise de poids plus importante suite à l'exposition à un régime palatable hyperlipidique, et des perturbations de la régulation du poids dans le cas d'une privation alimentaire suivie

d'une période de réalimentation. Nous n'avons pas mis en évidence d'effet du régime maternel hyperlipidique *per se*, ni de modulation des effets du stress précoce par ce régime.

En revanche, nous avons démontré que le régime maternel hyperlipidique atténue les déficits cognitifs, les perturbations du comportement émotionnel et les altérations de l'activité de l'axe corticotrope, induits par le stress précoce. Nous avons aussi observé que le régime maternel hyperlipidique, chez les témoins, entraîne des altérations semblables à celles observées après un stress précoce.

***Nous aborderons, dans un premier temps, les effets différentiels du régime maternel hyperlipidique en fonction des pressions environnementales futures. Puis dans un deuxième temps, nous discuterons les potentiels mécanismes impliqués dans l'effet protecteur du régime maternel hyperlipidique sur les altérations induites par le stress précoce. Tout d'abord, nous allons discuter de la pertinence des modèles utilisés.***

## **I- Pertinence des modèles**

### **1.1. Choix des régimes**

#### *1.1.1. Choix du régime hyperlipidique*

L'accessibilité croissante à des nourritures palatables et riches en énergie contribue en partie à l'augmentation de la consommation alimentaire dans les sociétés occidentales et les pays en voie de développement (Andrieu et al., 2006; Drewnowski et Darmon, 2005; Drewnowski et Rolls, 2005; Popkin, 2001). En France, la part des lipides représente 37 à 42% de l'énergie totale consommée, avec 16% venant des lipides saturés (Astorg et al., 2004; Drewnowski et al., 1996; Perrin et al., 2002). Par ailleurs, la consommation d'huiles végétales riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 a diminué au profit des huiles riches en AGPI n-6 (Blasbalg et al., 2011; Kearney, 2010). Ce changement nutritionnel a entraîné un déséquilibre du ratio AGPI n-6/n-3. Alors que les recommandations de l'agence nationale de sécurité sanitaire (ANSES) préconisent un ratio AGPI n-6/n-3 inférieur à 5/1, en France, ce ratio se situe entre 11/1 et 14/1 (Astorg et al., 2004). Des déséquilibres encore plus importants de ce ratio AGPI n-6 /n-3,

sont retrouvés dans d'autres pays industrialisés tels que l'Australie (Meyer et al., 2003) et les Etats-Unis (Kris-Etherton et al., 2000) et dans certains pays émergents (Chine, Inde, Mexique).

Concernant les études animales, il existe une grande variété de régimes hyperlipidiques dont la composition en lipides varie entre 10 et 90% des kilocalories totales. La plupart de ces régimes hyperlipidiques utilisent des sources lipidiques animales, comme le lard. Nous souhaitons modéliser les habitudes alimentaires des sociétés modernes et en particulier l'augmentation de la consommation d'huiles végétales riches en AGPI n-6. Nous avons donc opté pour un régime dans lequel les lipides (39% des kilocalories totales) étaient obtenus par un mélange d'huiles de palme, de colza et de tournesol, permettant d'obtenir un ratio AGPI n-6/n-3 de 39/1.

Dans notre travail, l'exposition à ce régime hyperlipidique est restreinte aux périodes de gestation et lactation. Du fait de la relative faible teneur en lipides et de la période d'exposition courte, les mères sous régime hyperlipidique ne présentent aucun surpoids. Cette absence de prise de poids des mères sous régime hyperlipidique constitue un paramètre important, puisque l'obésité est connue pour entraîner une multitude d'altérations métaboliques (Bilbo et Tsang, 2010; Volpato et al., 2012), qui constituent des facteurs confondants dans les études sur les effets de la nutrition maternelle.

#### *1.1.2. Choix du régime témoin*

Il semble essentiel de comparer un régime expérimental avec un régime témoin dont les ingrédients constitutifs doivent correspondre au régime expérimental, excluant la variable nutritionnelle étudiée. Cependant, de manière surprenante, beaucoup d'études examinant les effets d'un régime hyperlipidique n'utilisent pas de régime témoin adéquat. Une des pratiques les plus communes est l'utilisation de régime standard de laboratoire en tant que régime témoin. Cependant, la composition de ces régimes est soumise à des variabilités de composition entre les différentes séries de production, introduisant un biais concernant la reproductibilité des résultats notamment. Par ailleurs, les compositions en protéines, en glucides, en fibres, en vitamines ou minéraux peuvent être très différentes du régime expérimental. Par exemple, si une étude met en évidence des effets d'un régime pauvre en lipides par

rapport à un régime standard de laboratoire, la conclusion apportée sera sans doute que ces effets s'expliquent par les différences de composition en lipides. Or, ces effets pourraient être dus à une différence de composition en protéines ou de tout autre composé du régime. Une étude parue en 2008 a rapporté que parmi 35 études, publiées dans des journaux à fort impact facteur, qui s'intéressaient au régime hyperlipidique, presque la moitié utilisait le régime standard de laboratoire comme régime témoin, démontrant le manque d'attention porté au groupe témoin (Warden et Fisler, 2008). Par ailleurs, de plus en plus d'études suggèrent que les effets médiateurs de la nutrition pourraient passer par des processus épigénétiques, notamment *via* les vitamines telles que le folate ou la choline (Choi et Friso, 2010). Il est donc crucial d'ajuster la composition du régime témoin. Nous avons donc choisi, dans notre étude, d'utiliser un régime témoin ne différant du régime hyperlipidique que par sa composition en lipides, permettant ainsi d'isoler cette variable comme source des effets observés. Par ailleurs, la composition en AGPI n-6 et n-3 est ajustée pour correspondre au ratio AGPI n-6/n-3 recommandé de 5/1 (Patterson et al., 2012).

## **1.2. Pertinence du modèle de stress précoce**

### *1.2.1. Séparation maternelle comme modèle de stress précoce*

Comme chez de nombreuses espèces nidicoles, le raton présente une grande immaturité à la naissance. L'interaction entre la mère et le petit va alors avoir un rôle important pour son développement (Barbazanges et al., 1996; Levine, 1966; Maccari et al., 1995; Rosenfeld et al., 1993). Hofer avait élaboré une théorie de facteurs régulateurs « sous-jacents » liés à cette interaction mère-petit (Hofer, 2001). Ces facteurs seraient impliqués dans la régulation des processus physiologiques comme notamment le maintien de la température corporelle, le rythme cardiaque, les cycles veille-sommeil, l'activité gastro-intestinale (Hofer et Shair, 1982). Par ailleurs, la présence de la mère va permettre de moduler les taux de glucocorticoïdes chez le petit. Pendant les premières semaines de vie, il existe une période d'hypo-réponse au stress, caractérisée par une faible activité de l'axe corticotrope. Cette période qui s'étale de J4 à J14, est considérée comme un mécanisme adaptatif afin de prévenir l'exposition à des taux élevés de glucocorticoïdes, connus pour être délétères pendant l'ontogénie du système nerveux



central (Edwards et Burnham, 2001; Maccari et al., 2003). Ainsi, des perturbations de l'interaction mère-petit pendant les phases précoces, via des séparations, entraînent des altérations persistantes sur les réponses physiologiques et comportementales à l'âge adulte. De nombreux modèles de séparation ont été développés, qui varient en fonction de la fréquence et de la durée de séparation, pour revue Lehmann et Feldon (2000).

Il a été montré que les conséquences de privations maternelles aigües pendant 24h étaient en partie liées à des carences nutritionnelles résultant d'un manque d'allaitement maternel prolongé (Schmidt et al., 2006). Etant donné que notre travail impliquait une manipulation nutritionnelle (régime maternel hyperlipidique), nous avons donc choisi le modèle de la séparation maternelle chronique (3h/j entre J2-14) dont les effets à long terme ne sont pas attribués à une carence nutritionnelle pendant la séparation. Par ailleurs, les nombreuses études au cours des 50 dernières années ont permis d'établir une bonne caractérisation de ce modèle, ce qui offrait un avantage supplémentaire pour étudier l'impact du régime maternel hyperlipidique sur les conséquences à long terme de la séparation maternelle.

Il est important de noter que, bien que les manipulations des expériences précoces chez l'animal aient été utilisées pour expliquer les séquelles liées à l'abus physiques ou sexuels chez l'enfant, les modèles animaux restent principalement basés sur la carence de soins maternels. Nous sommes conscients que ces modèles s'apparentent plus à des situations de négligences ou de carences de soins que des abus physiques ou sexuels.

### *1.2.2. Choix du groupe témoin*

Par ailleurs, il existe 2 types de groupes témoins possibles, des rats séparés pendant une courte période (« handling ») ou des rats non dérangés et laissés avec leur mère jusqu'au sevrage. Le choix des groupes témoins a toujours été une source de débat dans la littérature. La procédure du « handling » permet de mimer ce qui se passe dans la vie naturelle, où la mère doit s'absenter de la portée afin de se nourrir. Par ailleurs, le « handling » constitue un groupe témoin approprié dans le sens où les rats sont soumis aux mêmes types de manipulations, avec pour seule différence la durée de séparation avec la mère. Cependant, il a été montré que cette procédure, en elle-même, a des effets « bénéfiques » et améliore, par exemple, la réactivité au stress et les

comportements de type anxieux (Levine, 1966; Meaney et al., 1991; Vallee et al., 1999; Vallee et al., 1997).

Dans le groupe « non dérangé », les ratons sont soumis aux conditions d'élevage du laboratoire (*i.e* changement de litière) mais restent avec leur mère jusqu'à la fin de la lactation. Certains auteurs ont proposé que les groupes « non dérangé », « courte séparation maternelle (handling) » et « longue séparation maternelle » correspondent à une échelle croissante de degrés de challenge (Macri et Wurbel, 2006). Notre but premier étant d'examiner l'impact du régime maternel hyperlipidique sur les effets délétères de la séparation maternelle, nous avons utilisé les deux groupes qui correspondent des degrés de challenge extrêmes. Dans notre étude, notre groupe témoin consistait donc à laisser les ratons témoins avec leur mère pendant toute la période de la lactation.

## II- Effets différentiels du régime maternel hyperlipidique en fonction du contexte environnemental

### 2.1. Effet délétère ou protecteur du régime maternel hyperlipidique ?

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous sommes intéressées à l'impact du régime hyperlipidique sur la fonction hippocampique. Nous avons observé que les descendants adultes exposés au régime maternel hyperlipidique présentent, au niveau de l'hippocampe, des modifications d'expression de certains gènes comme la doublecortine, le transporteur de glucose 3 et le récepteur à l'insuline. Ceci suggère que l'exposition précoce à un régime hyperlipidique entraîne, de façon durable, une altération du profil d'expression génique dans l'hippocampe. Ces altérations ne sont, cependant, pas associées à des perturbations de la mémoire spatiale, ce qui indique qu'elles ne sont pas drastiques au point de moduler les performances mnésiques dépendantes de l'hippocampe.

Dans les travaux présentés en troisième partie, nous avons observé que le régime maternel hyperlipidique entraîne des altérations similaires à celles induites par le stress précoce. En effet, comme dans le cas de rats soumis à la séparation maternelle, les rats exposés au régime maternel hyperlipidique ont des perturbations de la réponse neuroendocrine au stress ainsi qu'une hypersensibilité viscérale. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui montrent qu'un régime périnatal hyperlipidique induit des dysfonctionnements de l'activité de l'axe corticotrope (Trottier et al., 1998; Walker et al., 2008). De manière intéressante, nous retrouvons aussi que le régime maternel *per se* entraîne des modifications de l'expression de certains marqueurs dans le cortex préfrontal des rats de 11 jours. En effet, l'exposition précoce à ce régime diminue l'expression de Bdnf et tend à diminuer l'expression de Crh, induisant ainsi un profil d'expression des gènes semblable à celui des rats exposés à la séparation maternelle. Du fait du rôle du BDNF et de la CRH dans le développement neuronal, des altérations de ces marqueurs pourraient être associées à des perturbations de la mise en place des circuits neuronaux dans le cortex préfrontal. Or, le cortex préfrontal joue un rôle important dans la modulation de l'activité de l'axe corticotrope et des comportements émotionnels (Arnsten, 2009; Ulrich-Lai et Herman, 2009). Il nous apparaît alors

important de noter que des altérations des comportements émotionnels auraient pu être observés si les animaux avaient été testés plus jeune, et donc peu de temps après l'arrêt de l'exposition au régime hyperlipidique. Certains résultats de ce travail suggèrent néanmoins que le régime maternel hyperlipidique perturbe, de manière transitoire, certains comportements. En effet, dans la deuxième partie de notre travail, nous avons mis en évidence que le régime maternel hyperlipidique est associé à une augmentation de la motivation pour des aliments palatables au cours de l'adolescence, qui disparaît ensuite à l'âge adulte. Ce résultat peut s'expliquer par la plus grande sensibilité aux stimuli récompensants lors de l'adolescence mais peut aussi être lié au fait que le temps entre l'arrêt de l'exposition au régime hyperlipidique (sevrage) et le moment d'évaluation (adolescence tardive) était relativement court. En effet, nous pouvons supposer que les effets liés à l'exposition précoce au régime hyperlipidique s'atténuent avec le temps, notamment quand les animaux sont nourris avec un régime témoin après le sevrage. Par ailleurs, certaines études montrent que les effets du régime maternel sur le poids (Mitra et al., 2009) ou sur la mémoire spatiale (Tozuka et al., 2010) ne sont que transitoires et disparaissent ensuite à l'âge adulte. Ainsi, la transition du régime hyperlipidique vers un régime témoin au sevrage pourrait permettre de restaurer certaines altérations induites par l'exposition au régime hyperlipidique pendant la période précoce. Cette supposition est renforcée par les résultats obtenus dans notre première étude. En effet, les animaux exposés au régime hyperlipidique en période périnatale, puis placés sous régime témoin ne présentent aucun déficit de mémoire. En revanche, nous avons mis en évidence que des rats exposés au régime maternel hyperlipidique et maintenus sous ce même régime à l'âge adulte ont des déficits de mémoire spatiale dans la tâche du labyrinthe aquatique, ainsi qu'une diminution de la production de néo-neurones dans l'hippocampe et des altérations de l'expression de certains marqueurs impliqués dans la transmission synaptique. De telles perturbations ne sont pas retrouvées chez des animaux exposés au régime après le sevrage, ce qui suggère un rôle de la période périnatale dans les déficits observés dans le groupe exposé au régime hyperlipidique de la conception jusqu'à l'âge adulte.

En résumé, le régime maternel hyperlipidique entraîne des modifications moléculaires subtiles qui n'ont pas d'impact direct sur le comportement à l'âge adulte, mais qui favoriseraient l'émergence de troubles comportementaux dans le cas d'une exposition future à un régime hyperlipidique. Ainsi, l'exposition à un régime précoce hyperlipidique

représenterait un facteur de vulnérabilité dans le cas d'expositions futures à des situations de challenge environnementales.

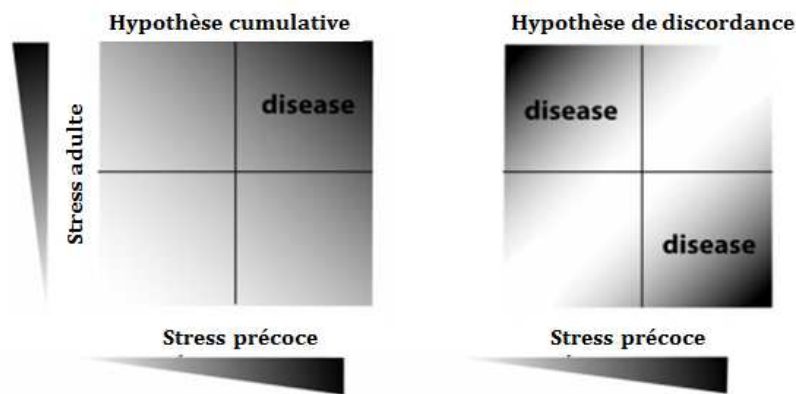
De façon intéressante, dans la troisième partie de ce travail, nous avons mis en évidence, pour la première fois, que le régime maternel hyperlipidique pendant la période périnatale protège contre les conséquences délétères à long terme induites par un stress précoce. Ainsi, les descendants exposés à la combinaison séparation maternelle/régime maternel hyperlipidique, ne présentent aucun déficit comportemental et aucune modification de la réactivité au stress, à l'âge adulte. Par ailleurs, l'exposition au régime maternel hyperlipidique restaure les altérations d'expression génique dues au stress dans le cortex préfrontal des rats. Ceci suggère, de manière surprenante, que dans certaines situations, le régime maternel hyperlipidique peut être « bénéfique ».

## **2.2. Théories pouvant expliquer l'effet différentiel du régime maternel hyperlipidique sur la sphère cognitivo-émotionnelle**

Le régime maternel hyperlipidique serait « néfaste » si l'animal se trouve dans un environnement précoce « normal » mais serait, bénéfique dans des situations où les pressions environnementales sont élevées, comme dans le cas d'un stress précoce.

Etant donné les effets du régime hyperlipidique à l'âge adulte, il a été suggéré que le régime hyperlipidique pourrait être considéré comme un « stressor » (Legendre et Harris, 2006; Tannenbaum et al., 1997). Nous proposons donc que le régime maternel hyperlipidique peut être apparenté à un stress précoce. Dans notre cas, le régime maternel hyperlipidique pendant la gestation et la lactation représente sans doute une combinaison d'un « stress » prénatal et postnatal. Il serait d'ailleurs intéressant de comparer les effets du régime maternel hyperlipidique en restreignant l'exposition au régime à une seule de ces deux périodes.

Il existe deux théories dans le cas d'une exposition à de multiples « stressors » au cours de la vie, l'hypothèse cumulative ou l'hypothèse de discordance (**Figure 7**) (Nederhof et Schmidt, 2012).



**Figure 7: Schéma représentant les deux hypothèses dans le cas d'expositions multiples au stress** (adapté de Nederhof et Schmidt, 2012)

L'hypothèse de la « discordance » postule que la discordance entre les pressions environnementales pendant la période précoce et celles à l'âge adulte, aboutit à l'émergence de troubles. Dans cette dernière, il est proposé qu'un environnement précoce « délétère » permette une adaptation dans le cas d'une exposition future à un environnement « délétère ». Dès lors, le fait d'expérimenter des situations stressantes pendant la période précoce fournirait des capacités d'adaptation permettant de lutter contre le stress à l'âge adulte. Cette théorie de la discordance peut être utilisée dans le cas d'une combinaison entre un stress prénatal et postnatal. Ainsi, l'exposition à un environnement prénatal délétère permettrait d'être « adapté » dans le cas d'une exposition à un stress postnatal.

Cette théorie est appuyée par des travaux de la littérature. En effet, il a été montré qu'un stress prénatal diminue les vocalisations émises par des petits séparés de leur mère pendant la lactation, suggérant ainsi que le stress prénatal atténue les effets d'un stress postnatal (Morgan et al., 1999). Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas d'un « stress prénatal nutritionnel ». Il a été montré qu'une carence en protéines pendant la gestation contrecarre la diminution de prolifération cellulaire dans le gyrus dentelé de l'hippocampe induite par une séparation maternelle de 30min chez des rats de 7 jours (King et al., 2004). Un environnement prénatal « délétère » apparaît alors comme protecteur contre les effets néfastes d'un stress postnatal.

Ainsi, nous proposons que l'exposition au régime maternel hyperlipidique pendant la période périnatale représenterait un « stress » pour le petit en développement, qui entraînerait des modifications physiologiques ou moléculaires, permettant de modeler et d'adapter l'organisme à une exposition future au stress de séparation maternelle (voir

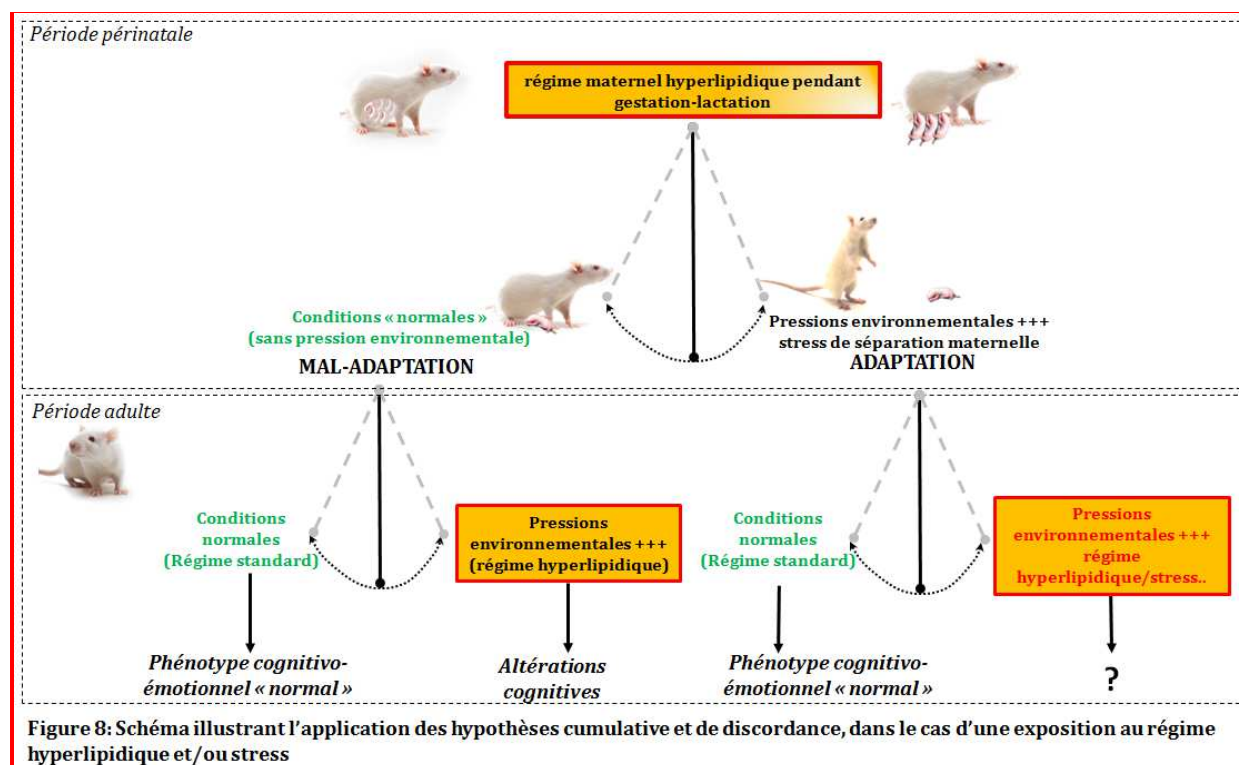
partie III). En revanche, ces modifications induites par l'exposition précoce au régime hyperlipidique seraient délétères chez les rats témoins, où les pressions environnementales sont absentes.

A contrario, l'hypothèse est du stress cumulé (« cumulative »), postule que la combinaison d'un stress précoce et d'un stress adulte amène à l'émergence de troubles. Nous proposons d'appliquer cette hypothèse dans notre cas d'exposition à un régime maternel hyperlipidique pendant la période précoce suivie d'une exposition à ce même régime en post sevrage. Ainsi, cette hypothèse cumulative expliquerait la présence de déficits mnésiques chez les animaux exposés au régime hyperlipidique tout au long de la vie, ainsi que l'absence de déficit chez les animaux exposés au régime seulement pendant la période précoce.

**En résumé, nous proposons que les deux hypothèses (de la discordance et cumulative) interviennent mais à différents moments de la vie. En effet, pendant la période périnatale, qui est une période de haute plasticité et donc de vulnérabilité aux facteurs environnementaux, l'hypothèse appliquée serait en faveur de celle de la discordance. Ainsi, l'exposition au régime maternel hyperlipidique pendant la gestation et la lactation serait considérée comme une pression environnementale élevée, et serait donc 1) prédictive d'une adaptation dans le cas d'une exposition future à l'adversité, comme un stress de séparation maternelle ou 2) au contraire associée à une mal-adaptation dans le cas d'une faible pression environnementale.**

**Cependant, à l'âge adulte, l'hypothèse adoptée serait celle de l'hypothèse cumulative. A savoir, le régime hyperlipidique en post sevrage combinée à l'exposition au régime maternel hyperlipidique pendant la période précoce, aboutirait à l'émergence d'altérations cognitives.**

Ces deux hypothèses appliquées à notre travail sont représentées dans le schéma de la **Figure 8**.





### **III- Mécanismes potentiels sous-tendant l'effet protecteur du régime maternel hyperlipidique contre les altérations induites par la séparation maternelle**

#### **3.1. Médiation directe sur le raton en développement**

##### *3.1.1. Modulation par des facteurs « métaboliques »*

Bien que ce soit la mère qui consomme le régime hyperlipidique, les petits y sont exposés, pendant la gestation et pendant la lactation via le lait maternel. Une des premières hypothèses pouvant être avancée serait que les ratons de mères sous régime hyperlipidique pourraient être plus « résistants » à la séparation maternelle. Nous n'avons observé aucun effet du régime maternel sur le poids des petits au cours de la lactation. De plus, nous n'avons observé aucune perte de poids significative pendant les 3h de séparation, et aucune différence entre les ratons exposés au régime standard et ceux exposés au régime hyperlipidique. Cependant, nous ne pouvons exclure que le métabolisme des ratons exposés au régime maternel hyperlipidique puisse les rendre plus résistants au stress de séparation. De nombreux travaux montrent que la leptine peut agir sur le fonctionnement de l'axe corticotrope. Ainsi, la leptine inhibe la libération de CRH de l'hypothalamus in vitro et atténue l'augmentation d'ACTH et de CORT induite par un stress in vivo (Heiman et al., 1997). Dans notre travail, le régime de la mère n'a aucun impact sur les taux de leptine plasmatique chez le raton pendant le développement, ceci suggère donc que la leptine n'est pas impliquée dans l'effet protecteur du régime maternel hyperlipidique.

Par ailleurs, la consommation de régime hyperlipidique par la mère modifie la composition du lait. En effet, il a été mis en évidence que la composition en lipides (Rolls et al., 1986; Trottier et al., 1998), en leptine (Walker et al., 2008) et en insuline (Gorski et al., 2006) augmente dans le lait des mères nourries au régime hyperlipidique, en comparaison des mères sous régime standard. Ainsi, les effets modulateurs du régime maternel hyperlipidique sur les effets de la séparation maternelle pourraient résulter de l'exposition à certains facteurs présents dans le lait. En mesurant la quantité de lipides

dans le contenu stomacal des petits, aucun impact du régime maternel n'a pu être mis en évidence sur le pourcentage total de lipides. En revanche, des variations du type de lipides ont été observées, et notamment une augmentation des AGPI n-6, et une réduction des AGPI n-3. Or, il a été montré que ces AGPI interviennent dans de nombreux processus physiologiques et moléculaires, comme les processus inflammatoires (Laye, 2010) ou encore la régulation de l'expression des gènes (Jump, 2002; Sessler et al., 1996). Quelques processus impliquant ces AGPI dans les effets protecteurs du stress précoce seront discutés par la suite. Par ailleurs, de manière surprenante, nous avons mis en évidence que le lait « hyperlipidique » contient une plus faible proportion d'acides gras saturés par rapport au régime témoin. Ce résultat est surprenant contenu du fait que le régime hyperlipidique contient quasiment deux fois plus d'acides gras saturés. Ceci suggère donc que la composition du lait ne reflète pas la composition du régime ingéré par la mère. Ainsi, *via* un contrôle de la composition du lait maternel, l'exposition au régime maternel hyperlipidique, chez le petit, ne serait pas aussi délétère qu'une exposition directe à ce régime.

### *3.1.2. Modulation de l'axe cerveau-intestin*

La séparation maternelle augmente la perméabilité intestinale (Gareau et al., 2007) *via* une action potentielle des glucocorticoïdes (Moussaoui et al., 2014). Par ailleurs, il a été mis en évidence que l'administration d'un antagoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes (RU486) ou l'administration d'un inhibiteur de la kinase des chaînes légères de myosine responsables de la contraction des cellules épithéliales (ML7), chez le raton, préviennent l'augmentation de la perméabilité induite par la séparation maternelle (Moussaoui et al., 2014). Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que l'administration chronique de ML7 chez les ratons avant chaque séparation atténue les altérations de l'activité de l'axe corticotrope et certains déficits comportementaux chez la descendance à l'âge adulte (Minni et al., en préparation). Ceci suggère que l'augmentation de la perméabilité intestinale pendant la séparation est en partie la cause des altérations à long terme associées à la séparation maternelle. De façon intéressante, nos collaborateurs ont très récemment observé qu'un régime maternel hyperlipidique réduit la perméabilité viscérale après une séparation

maternelle (Théodorou et al., données non publiées). De plus, l'administration d'acide palmitique, composant majeur de l'huile de palme, lipide présent en grande quantité dans la plupart des régimes hyperlipidiques, atténue l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par la séparation maternelle chez le raton (Benoit et al., 2014, non publié). Au regard de ces résultats, nous proposons que le régime maternel hyperlipidique riche en AGPI n-6 restaure les altérations de la fonction intestinale des ratons pendant le développement, expliquant ainsi l'absence de déficits à long terme induits par la séparation maternelle.

Par ailleurs, l'augmentation de la perméabilité intestinale est associée à une augmentation de la translocation bactérienne (Gareau et al., 2007). La colonisation bactérienne pendant la période postnatale joue un rôle important dans le développement de l'axe corticotrope. Des souris élevées dans un environnement sans pathogène présentent une réponse CORT exagérée après un stress de contention ainsi qu'une diminution des niveaux de BDNF dans le cortex (Sudo et al., 2004). Il a été montré que l'exposition périnatale à un régime hyperlipidique modifie la composition du microbiote intestinal des descendants (Myles et al., 2013). Ainsi, l'exposition au régime maternel hyperlipidique pendant la période périnatale pourrait modifier la composition du microbiote intestinal des descendants, modulant ainsi les effets de la séparation maternelle. Parmi les mécanismes mis en jeu, il a été suggéré que le microbiote intestinal pourrait agir sur des processus épigénétiques (Shenderov, 2012). En effet, le microbiote intestinal produit des composés pouvant agir sur les acteurs des processus épigénétiques. Par exemple, la fermentation des fibres alimentaires par les bactéries produit des acides gras à chaînes courtes comme le butyrate (Bach Knudsen et al., 2003), qui sont des inhibiteurs des histones deacétylases (Licciardi et al., 2011), pouvant moduler l'expression des gènes *via* des modifications de la chromatine.

### *3.1.3. Modulations épigénétiques*

Les modèles animaux ont montré que le stress précoce est associé à des modifications de la méthylation de certains gènes codant par exemple, le récepteurs aux glucocorticoïdes, GR (Meaney and Szyf, 2005), la CRH (Wang et al., 2014) ou encore le

BDNF (Roth et al., 2009; Roth and Sweatt, 2011). Il a été montré que l'administration d'un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, la zebularine, module les changements d'expression de Bdnf induite par le stress précoce (Roth et al., 2009).

De plus en plus de travaux mettent en évidence le rôle des facteurs nutritionnels dans les phénomènes de régulation épigénétique (voir revue, Dauncey, 2013). Dans une grande variété d'espèces, il a été mis en évidence que les nutriments peuvent ainsi agir sur les profils de méthylation et influencer le phénotype (Mckay and Mathers, 2011; Wakeling et al., 2009). L'un des exemples représentatifs de cette régulation nutritionnelle des processus épigénétiques est le cas de la détermination du phénotype des abeilles (ouvrière vs. reine). En effet, il a, récemment, été montré que le devenir de la larve dépend des méthylations de l'ADN qui sont modulées par les facteurs nutritionnels de la gelée royale (Weiner and Toth, 2012).

Une étude réalisée chez la souris, a mis en évidence que l'exposition *in utero* à un régime hyperlipidique entraîne des modifications du profil de méthylation des histones chez le fœtus, dont certaines qui persistent à l'âge adulte (Suter et al., 2014). Par ailleurs, certains travaux montrent que les effets à long terme du régime maternel hyperlipidique sur le phénotype de la descendance peuvent être attribués à des modulations épigénétiques. Ainsi, l'augmentation de la préférence pour les lipides, observée chez des descendants de mères sous régime hyperlipidique, est associée à des modifications d'expression des récepteurs opioïdes mu et du transporteur de la dopamine dans le noyau accumbens. L'administration de donneurs de méthyles en plus du régime hyperlipidique chez la mère contrecarre ces altérations du système de récompense et normalise la préférence pour les lipides (Carlin et al., 2013a).

Dans notre travail, nous avons montré que le régime maternel hyperlipidique atténue l'induction de Rest4, un facteur de transcription intervenant dans la différenciation cellulaire, et qu'il normalise l'expression basale de Bdnf, Crh et 5HT-r1A dans le cortex préfrontal des rats exposés à la séparation maternelle.

En utilisant des modèles transgéniques, il a été montré l'implication directe du récepteur 5HT-r1A dans les comportements de type anxieux à l'âge adulte (Gross et al., 2002). Par ailleurs, de plus en plus de données suggèrent l'implication du BDNF dans la vulnérabilité émotionnelle, pour revue (Autry and Monteggia, 2012). Ainsi, nous proposons que la restauration des niveaux d'expression de ces marqueurs dans le cortex

préfrontal des rats stressés, par le régime maternel hyperlipidique, *via* des processus épigénétiques, serait en partie responsable de l'absence de déficits émotionnels à l'âge adulte. Les modifications épigénétiques induites par le régime maternel hyperlipidique pourraient interagir avec les altérations épigénétiques causées par le stress précoce, et aboutir à une normalisation du profil de méthylation.

Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer les acteurs ainsi que les cibles impliqués dans l'effet du régime maternel hyperlipidique sur la restauration des profils d'expression génique des rats exposés à la séparation maternelle.

**Nous venons de voir que l'effet protecteur du régime maternel hyperlipidique pourrait s'expliquer par des effets directs chez le petit. Cependant, d'autres processus pourraient être mis en jeu, et notamment un effet indirect via la mère.**

### **3.2. Effet indirect via la mère**

#### *3.2.1. Modulation du stress de la mère*

Etant données les interactions entre stress et régime hyperlipidique, nous avons étudié l'impact de ce régime sur le stress de la mère séparée de ses rats.

En effet, la mère consomme le régime hyperlipidique. De plus, cette procédure de séparation maternelle est non seulement un stress pour le raton mais aussi pour la mère. Ainsi, des études ont mis en évidence une augmentation à long terme des comportements de type anxieux et dépressifs chez des mères soumises au protocole de séparation maternelle (Aguggia et al., 2013; Boccia et al., 2007; Maniam and Morris, 2010a; Toigo et al., 2012). Dans notre étude, nous avons observé que les mères sous régime hyperlipidique consomment plus de nourriture pendant les 3h de séparation. Cette augmentation de la consommation alimentaire est spécifique des sessions de stress, puisque la consommation quotidienne totale chez ces mères ne diffèrent pas de celle des mères sous régime témoin. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature rapportant une augmentation de nourriture palatable induite par le stress (la Fleur et al., 2005; Pecoraro et al., 2004). A la fin des deux semaines de séparation, les mères stressées sous régime hyperlipidique sont moins anxieuses que les mères

stressées sous régime témoin. Ainsi, la consommation du régime hyperlipidique palatable permet d'atténuer les comportements de type anxieux, suggérant un effet « anti-stress » du régime.

Des travaux montrent que la mère a un rôle important dans les effets de la séparation maternelle. Ainsi, Huot et al. ont montré que lorsque l'on donne une portée de substitution à la mère pendant la période où elle est séparée de ses petits, les dysfonctions de l'axe corticotrope induits par la séparation maternelle, chez la descendance adulte, sont atténués (Huot et al., 2004). Ceci suggère que la réduction du stress chez la mère prévient les effets à long terme de la séparation maternelle chez la descendance. Dans le cadre de notre travail, nous proposons que la consommation du régime hyperlipidique pendant la séparation puisse avoir un effet « anti-stress » chez la mère, qui participerait à l'atténuation des conséquences délétères de la séparation maternelle chez le petit.

### *3.2.2. Modulation du comportement maternel*

Par ailleurs, nous avons observé une augmentation du comportement maternel chez les mères stressées sous régime hyperlipidique par rapport aux mères stressées sous régime témoin. Ce résultat est en accord avec des travaux précédents qui ont mis en évidence que la consommation d'un régime hyperlipidique augmente le soin apporté aux petits, (Bertino, 1982; Purcell et al., 2011). Les processus sous tendant cette augmentation du comportement maternel ne sont pas encore connus. Cependant, des résultats que nous avons obtenus tout récemment, laisseraient présager d'un rôle du petit dans l'augmentation du comportement maternel des mères. Dans ce travail, nous avons examiné l'impact du régime maternel hyperlipidique sur les ultrasons émis lors d'une séparation maternelle. En effet, quand la mère s'éloigne du raton, il émet alors des ultrasons situés entre 30 et 90Hz destinés à diriger le comportement maternel de la mère (Hofer and Shair, 1978; Noirot, 1972). Nos résultats préliminaires indiquent que les ratons exposés au régime maternel hyperlipidique ont tendance à émettre plus d'ultrasons quand ils sont séparés de la mère. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que l'augmentation des ultrasons émis par les ratons exposés au régime maternel hyperlipidique, potentialise le comportement maternel de la mère. Cette augmentation

du comportement maternel chez les mères sous régime hyperlipidique pourrait être médiée par les effets directs du régime. En effet, il a été montré que la consommation d'un régime hyperlipidique modifie le système dopaminergique (Carlin et al., 2013b), qui se trouve être, par ailleurs, en lien étroit avec le comportement maternel. En effet, il a été montré que des mères présentant un comportement maternel élevé, ont une augmentation des pics de dopamine dans le noyau accumbens, pendant les interactions avec les petits (Shahrokh et al., 2010). Il semble que la consommation du régime hyperlipidique modifie les propriétés récompensantes de l'interaction avec les petits, amenant ainsi la mère à augmenter son comportement maternel.

Le rôle du comportement maternel dans les effets à long terme de la séparation maternelle est sujet à débat. La théorie de la médiation maternelle (Denenberg, 1999; Denenberg et al., 1962) postule que les différences de soins maternels contribuent en grande partie aux différences de réactivité au stress de la descendance à l'âge adulte. En effet, il a été montré que le «handling» stimule le comportement maternel, en particulier la fréquence de léchage des petits et l'allaitement actif et que le niveau de ces soins maternels est négativement corrélé avec les niveaux de stress et de comportement de type anxieux chez la descendance adulte (Caldji et al., 1998; Liu et al., 1997; Meaney, 2001). L'hypothèse d'une médiation maternelle a ensuite été confirmée par des travaux qui montrent que les variations interindividuelles de soins maternels sont associées avec des différences d'anxiété et de réponses au stress chez la descendance à l'âge adulte (Cameron et al., 2005; Champagne et al., 2003b; Francis and Meaney, 1999; Maccari et al., 1995). Cependant, certains travaux contredisent cette hypothèse de la médiation maternelle.

En effet, une étude a montré que, tout comme la procédure du «handling», la séparation maternelle augmente le soin envers les petits. Cependant, alors que le handling est associé à une réduction de la réactivité au stress à l'âge adulte, la séparation maternelle produit l'effet inverse, avec une potentialisation de la réponse au stress (Macri et al., 2004). Ceci suggère donc le comportement maternel, *per se*, ne peut expliquer les effets à long terme de la séparation maternelle sur la réactivité au stress des descendants. Néanmoins, nous ne pouvons exclure l'implication de la potentialisation du comportement maternel chez les mères sous régime hyperlipidique dans la protection des altérations induites par le stress précoce chez la descendance adulte.

Etant donné la complexité du modèle de la séparation maternelle, il paraît difficile d'isoler un seul et unique facteur responsable des effets protecteurs du régime maternel hyperlipidique. Nous proposons qu'il résulte probablement d'une combinaison d'effets directs chez le petit en développement et des effets indirects chez la mère via l'effet anti-stress du régime et/ou la potentialisation du comportement maternel. Cependant, nous proposons que les processus épigénétiques jouent un rôle dans chacun de ces différents effets. Les perspectives de ce travail seraient donc d'étudier les possibles interactions entre les modulations épigénétiques induits par le stress précoce et celles engendrées par le régime maternel hyperlipidique pouvant influencer la programmation du comportement émotionnel et de la réactivité au stress à l'âge adulte. L'hypothèse serait que le régime maternel hyperlipidique restaure le profil de méthylation dans le cortex préfrontal des rats exposés à la séparation maternelle. Nous nous attendrions donc à ce que les niveaux de méthylation, notamment au niveau des promoteurs des gènes du *Bdnf*, *Crf* et du récepteur à la sérotonine 1A, soient altérés seulement chez les rats stressés précocement issus de mères sous régime témoin. Par ailleurs, il serait intéressant de moduler sur les processus de méthylation, en utilisant par exemple, des inhibiteurs des DNMT (DNA méthyltransférases), ou des donneurs de méthyl en plus du régime hyperlipidique, afin de déterminer le rôle de ces processus épigénétiques dans les effets combinés du stress précoce et du régime maternel hyperlipidique.

La **figure 9** représente un schéma bilan représentant comment les interactions entre le stress et la nutrition précoce au travers de potentiels processus épigénétiques agissent sur la programmation du phénotype adulte.



## Conclusion

---

Nos résultats contribuent à la démonstration de l'importance de la nutrition et du stress pendant la période précoce en tant qu'agent de programmation du phénotype adulte. Nous avons mis en évidence qu'un environnement nutritionnel hyperlipidique, indépendamment de l'obésité maternelle, entraîne des effets à long terme sur les taux plasmatiques de certains facteurs métaboliques, sans pour autant modifier le poids des descendants à l'âge adulte. Ceci suggère donc qu'un environnement nutritionnel précoce hyperlipidique peut laisser une empreinte durable sur le phénotype métabolique de la descendance. En revanche, l'exposition précoce au régime hyperlipidique, bien qu'il altère l'expression de nombreux gènes au sein de l'hippocampe, n'a pas d'effets majeurs sur la sphère cognitivo-émotionnelle, sauf si ce régime est maintenu après le sevrage. Ces résultats soulignent l'importance de la nutrition précoce en tant que facteur de vulnérabilité, notamment dans le cas de mauvaises habitudes alimentaires à l'âge adulte. Par ailleurs, nous avons mis en évidence l'implication du stress précoce dans la programmation du phénotype métabolique à l'âge adulte, avec en particulier une vulnérabilité à la prise de poids dans un environnement hyperlipidique palatable. Ainsi, l'environnement nutritionnel doit faire l'objet d'une attention particulière chez les individus exposés à l'adversité pendant l'enfance.

En revanche, nos résultats démontrent que le régime maternel hyperlipidique protège la descendance des effets délétères du stress précoce sur la sphère cognitivo-émotionnelle. Cet effet protecteur pourrait être sous-tendu par un effet de la nutrition hyperlipidique précoce sur la maturation du cortex préfrontal, mais également par un effet « confort food » chez les mères exposées au stress.

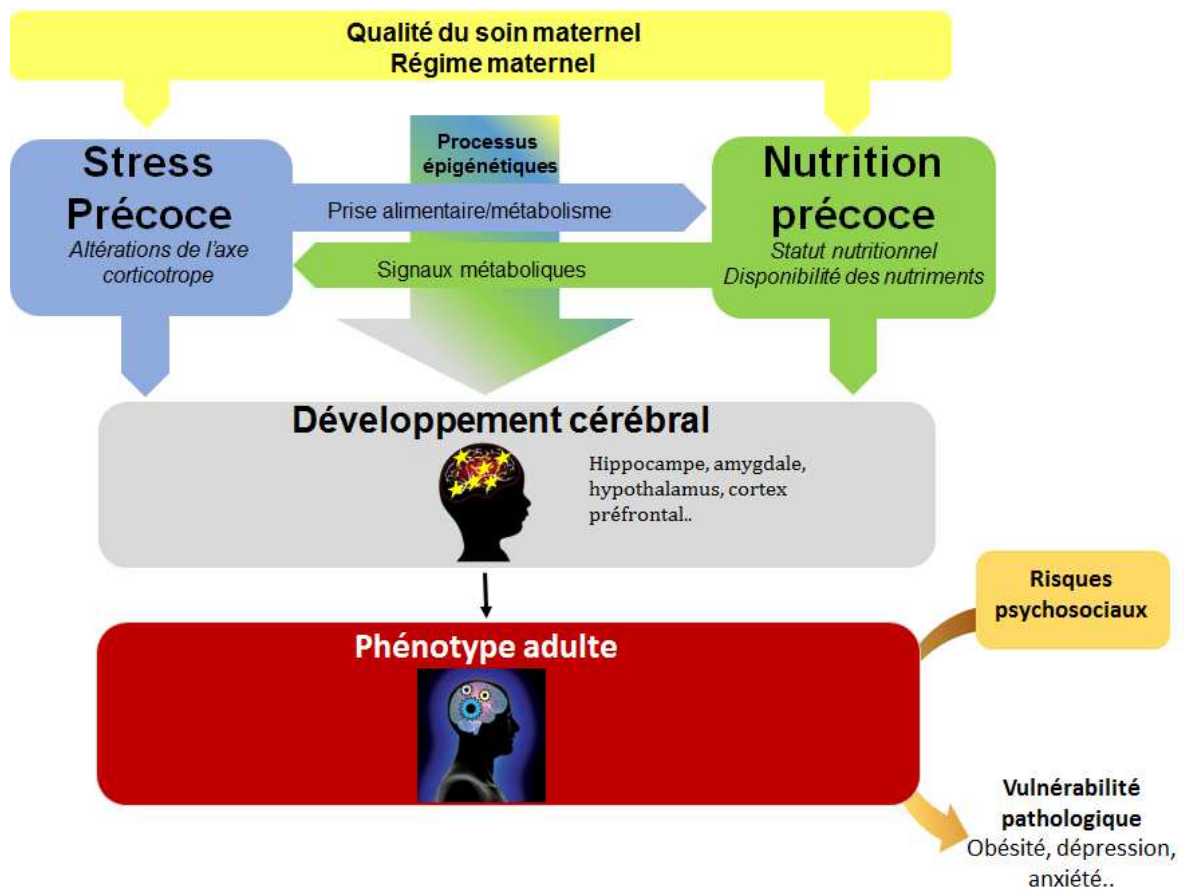


Figure 9: Schéma bilan illustrant les interactions entre le stress et la nutrition pendant la période précoce dans la programmation du phénotype adulte (adapté de Lucassen et al., 2013).

## Liste des figures

---

Figure 1 : Schéma de l'axe corticotrope

Figure 2 : Schéma récapitulatif des conséquences de l'adversité précoce sur la vulnérabilité à long terme

Figure 3 : Schéma des altérations à long terme de la séparation maternelle ainsi que les perturbations neuroendocrines et neurobiologiques pouvant tendre ces altérations.

Figure 4 : Schéma hypothétique des mécanismes impliqués dans l'interaction entre stress et la nourriture palatable

Figure 5 : Schéma résumant les cibles et voies impliquées dans les effets à long terme d'un régime maternel hyperlipidique sur le développement de troubles métaboliques à l'âge adulte

Figure 6 : Schéma récapitulant les objectifs de ce travail de thèse

Figure 7 : Schéma des deux théories (discordance vs. cumulative) dans le cas d'expositions multiples au stress

Figure 8 : Schéma illustrant l'application des hypothèses « cumulative » et « de discordance », dans le cas d'une exposition au régime hyperlipidique et/ou stress

Figure 9 : Schéma bilan illustrant les interactions entre le stress et la nutrition pendant la période précoce dans la programmation du phénotype adulte

Tableau 1 : Résumé des altérations cérébrales, endocrines et immunitaires chez des enfants et adultes exposés à l'adversité précoce

Tableau 2 : Etudes examinant l'impact de la séparation maternelle sur les performances mnésiques

Tableau 3 : Conséquences de la séparation maternelle sur la sphère viscérale.

Tableau 4 : Bilan des effets du régime maternel hyperlipidique (HL) sur le phénotype comportemental et métabolique des descendants à l'âge adulte.

Tableau 5 : Bilan des effets de la séparation maternelle et du régime maternel hyperlipidique (HL) sur le phénotype métabolique et la motivation alimentaire des descendants à l'âge adulte.

Tableau 6 : Impact du régime maternel hyperlipidique sur les effets à long terme de la séparation maternelle chez les descendants à l'âge adulte.

Tableau 7 : Gènes significativement modulés par le régime maternel et/ou le stress précoce au jour postnatal 11

Tableau 8 : Gènes significativement modulés par le régime maternel et/ou le stress précoce après les 3 heures de séparation maternelle au jour postnatal

## Liste des abréviations

---

5HT : sérotonine  
5HT-r1A : récepteur à la sérotonine 1A  
ACTH : drénocorticotrophine  
Adcy5 adénylate cyclase 5  
ADN : acide désoxyribonucléique  
AGPI : acides gras poly-insaturés  
AMPA :  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid  
ANSES: l'agence nationale de sécurité sanitaire  
ATV : aire tegmentale ventrale  
BDNF : brain derived neurotrophic factor  
C (régime) : control diet  
Camk2a : calcium/calmodulin-dependent protein kinase2  $\alpha$   
CORT : corticostérone  
CPF : cortex préfrontal  
CRH : corticotropin-releasing hormone  
CRP : protéine C-réactive  
DEX : dexaméthasone  
DNMT: (DNA méthyltransférases),  
GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
GluR2 : sous-unité 2 des récepteurs AMPA  
GR : glucocorticoïdes  
Gria2 : sous unité AMPA 2  
Grin2b : sous unité NDMA 2b  
HL (régime) : régime hyperlipidique  
Iba1 : ionized calcium binding adaptor molecule 1  
IFN : interférons  
IL : interleukines  
InsR : récepteur à l'insuline  
ML7 : inhibiteur de la kinase de la chaîne légère de la myosine MLCK  
MR : récepteurs aux minéralocorticoïdes  
NFkB: Nuclear factor-kappa B  
NGF : nerve growth factor  
NMDA : acide N-méthyl-D-Aspartique

NPV : noyau paraventriculaire

Nr1 : sous-unité des récepteurs AMPA

NT3 : neurotrophine 3

PFC : cortex préfrontal

Rest4 : RE-1 silencing transcription factor-4

RU486 : mifepristone (antagoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes)

SERT : transporteur de la sérotonine

SII : syndrome de l'intestin irritable

SLC2a3 : gène codant le récepteur au glucose 3

SN : substance noire nigro-striée

TG : triglycérides

TNF : facteurs de nécrose tumorale

## Liste des publications

---

- Lépinay A.L.**, Larrieu T., Joffre C., Acar N., Garaté I., Castanon N., Ferreira G., Langelier B., Guesnet P., Bretillon L., Parnet P., Layé S., Darnaudéry M., Perinatal high-fat diet increases hippocampal vulnerability to the adverse effects of subsequent high-fat feeding. *Psychoneuroendocrinology* 2015, **53**:82-93.
- Lépinay A.L.**, Alonso L., Caillé-Garnier S., Cador M., Layé S., Darnaudéry M., Impact of a perinatal high-fat diet combined to maternal separation on responses to nutritional challenges and food motivation, En cours de soumission (*Frontiers in behavioral Neuroscience*)
- Lépinay A.L.**, Delage P., Rincel M., Fioramonti J., Theodorou V., Layé S., Darnaudéry M., Perinatal high-fat exposure through maternal diet protects against the adverse effects of early life stress, *En préparation*
- Joffre C., Castanon N., **Lépinay A.L.**, Aubert A., Parnet P., Guesnet P., Garaté I., Bretillon L., Ferreira G., Darnaudéry M., Layé S., Impact of maternal high-fat diet on inflammatory response to an immune challenge in the hippocampus. *En préparation*
- Minni A.M, Xia L., **Lépinay A.L.**, Ferrier L., Layé S., Théodorou V., Darnaudéry M., Restoration of visceral permeability in stressed neonates prevents long-term emotional disturbances in adulthood. *En préparation*
- Rincel M., **Lépinay A.L.**, Xia L., Aubert A., Sere A., Layé S., Darnaudéry M., Maternal high-fat diet prevents the decrease in basilar spine density in the medial prefrontal cortex of pups exposed to chronic maternal separation. *En préparation*

## Communications orales

**Lépinay A.L.**, Effet anti-stress d'un régime hyperlipidique dans le modèle de séparation maternelle chez le rat, *Société Française des Neurosciences- Réunion du club stress*, Lyon, France, 21 Mai 2013.

**Lépinay A.L.**, Maternal high fat diet attenuates emotional and neurobiological alterations induced by maternal separation in rats", *7<sup>th</sup> Meeting Nutrition & Neurosciences*, Bordeaux, France, 14 Mars 2014.

## Communications affichées

**Lépinay A.L.**, Delage P., Rincel M., Layé S., Darnaudéry M., Maternal high fat consumption protects offspring against neurobiological and emotional alterations induced by maternal separation, *9<sup>th</sup> Fens Forum of Neuroscience*, Milan (Italie) 5-9 Juillet, 2014.

Minni A.M., Xia L., **Lépinay A.L.**, Ferrier L., Layé S., Théodorou V., Darnaudéry M. Restoration of visceral permeability in stressed neonates prevents long-term emotional disturbances in adulthood., *EBPS Immunopsychiatry Workshop, Immune Influences on Brain & Behaviour: from Psychoneuroimmunology to Immunopsychiatry*, Brighton (Grande-Bretagne), 27-29 Juin 2014.

**Lépinay A.L.**, Minni A.M. Xia L., Ferrier L., Layé S., Théodorou V., Darnaudéry M., Restoration of visceral permeability in stressed neonates prevents long-term emotional disturbances in adulthood, *Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale de Bordeaux*, Arcachon (France), 9 Avril 2014.

Darnaudéry M., **Lépinay A.L.**, Caillé S., Cador M., Layé S., Maternal high fat diet reverses the emotional consequences of maternal separation in offspring but increases to diet-induced obesity, *European Behavioural Pharmacology Society*, La Rochelle (France), 6-9 Septembre 2013.

**Lépinay A.L.**, Joffre C., Larrieu T., Aubert A., Bretillon L., Parnet P., Guesnet P., Garate I., Castanon N, Ferreira G., Darnaudéry M., Layé S., Perinatal exposure to high fat diet:

sensitization to hippocampal dysfunctions induced by high fat diet in adulthood, *11<sup>ème</sup> Colloque de la Société des Neurosciences*, Lyon (France), 21-24 Mai 2013.

Minni A.M, **Lépinay A.L**, Delage P., Theodorou V., Fioramonti J., Layé S., Darnaudéry M., “Anti-stress” effect of maternal high fat diet in an animal model of maternal separation in rats, *11<sup>ème</sup> colloque de la Société des Neurosciences*, Lyon (France), 21-24 Mai 2013.

**Lépinay A.L**, Delage P., Theodorou V., Fioramonti J., Layé S., Darnaudéry M., “Anti-stress” effect of maternal high fat diet in an animal model of maternal separation in rats, *Journée de l'école doctorale de Bordeaux*, Arcachon (France), 10 Avril 2013.

**Lépinay A.L**, Delage P., Fioramonti J., Layé S., Darnaudéry M., Maternal High Fat Diet Reverses Behavioral Deficits Induced By Maternal Separation In Adult Offspring, *Journée SFR Neurosciences de Bordeaux*, Bordeaux (France), 29 Mai 2012.

**Lépinay A.L**, Delage P., Theodorou V., Fioramonti J., Layé S., Darnaudéry M., Maternal High Fat Diet Reverses Behavioral Deficits Induced By Maternal Separation In Adult Offspring , *Journée de l'école doctorale de Bordeaux*, Arcachon (France), 21 Avril 2012.

**Lépinay A.L** , Delage P., Fioramonti J., Layé S. and Darnaudéry M., Maternal High Fat Diet Reverses Behavioral Deficits Induced By Maternal Separation In Adult Offspring, *Assises de l'INRA*, Praz sur Arly (France), 10-13 Janvier 2012.



## References

---

- Abildgaard, A., Solskov, L., Volke, V., Harvey, B.H., Lund, S., Wegener, G., 2011. A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. *Psychoneuroendocrinology* 36, 623-633.
- Ader, R., 1968. Effects of early experiences on emotional and physiological reactivity in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 66, 264-268.
- Agid, O., Shapira, B., Zislin, J., Ritsner, M., Hanin, B., Murad, H., Troudart, T., Bloch, M., Heresco-Levy, U., Lerer, B., 1999. Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 4, 163-172.
- Aguggia, J.P., Suarez, M.M., Rivarola, M.A., 2013. Early maternal separation: neurobehavioral consequences in mother rats. *Behav Brain Res* 248, 25-31.
- Ahmed, S.H., 2010. Validation crisis in animal models of drug addiction: beyond non-disordered drug use toward drug addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 35, 172-184.
- Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W., Gage, F.H., 2014. Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition. *Physiol Rev* 94, 991-1026.
- Aisa, B., Elizalde, N., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., Ramirez, M.J., 2009. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus* 19, 1222-1231.
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., Ramirez, M.J., 2007. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32, 256-266.
- Al-Almaie, S.M., 2005. Prevalence of obesity and overweight among Saudi adolescents in Eastern Saudi Arabia. *Saudi Med J* 26, 607-611.
- Alsio, J., Pickering, C., Roman, E., Hulting, A.L., Lindblom, J., Schioth, H.B., 2009a. Motivation for sucrose in sated rats is predicted by low anxiety-like behavior. *Neurosci Lett* 454, 193-197.
- Alsio, J., Roman, E., Olszewski, P.K., Jonsson, P., Fredriksson, R., Levine, A.S., Meyerson, B.J., Hulting, A.L., Lindblom, J., Schioth, H.B., 2009b. Inverse association of high-fat diet preference and anxiety-like behavior: a putative role for urocortin 2. *Genes Brain Behav* 8, 193-202.
- Anda, R.F., Brown, D.W., Felitti, V.J., Bremner, J.D., Dube, S.R., Giles, W.H., 2007. Adverse childhood experiences and prescribed psychotropic medications in adults. *Am J Prev Med* 32, 389-394.
- Andersen, S.L., Teicher, M.H., 2004. Delayed effects of early stress on hippocampal development. *Neuropsychopharmacology* 29, 1988-1993.
- Andersen, S.L., Tomada, A., Vincow, E.S., Valente, E., Polcari, A., Teicher, M.H., 2008. Preliminary evidence for sensitive periods in the effect of childhood sexual

- abuse on regional brain development. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 20, 292-301.
- Andrieu, E., Darmon, N., Drewnowski, A., 2006. Low-cost diets: more energy, fewer nutrients. *Eur J Clin Nutr* 60, 434-436.
- Anisman, H., Zaharia, M.D., Meaney, M.J., Merali, Z., 1998. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int J Dev Neurosci* 16, 149-164.
- Antelman, S.M., Szechtman, H., 1975. Tail pinch induces eating in sated rats which appears to depend on nigrostriatal dopamine. *Science* 189, 731-733.
- Arborelius, L., Eklund, M.B., 2007. Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. *Neuroscience* 145, 738-750.
- Arnsten, A.F., 2009. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci* 10, 410-422.
- Astorg, P., Arnault, N., Czernichow, S., Noisette, N., Galan, P., Hercberg, S., 2004. Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women. *Lipids* 39, 527-535.
- Autry, A.E., Monteggia, L.M., 2012. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* 64, 238-258.
- Auvinen, H.E., Romijn, J.A., Biermasz, N.R., Pijl, H., Havekes, L.M., Smit, J.W., Rensen, P.C., Pereira, A.M., 2012. The effects of high fat diet on the basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice. *J Endocrinol* 214, 191-197.
- Avena, N.M., 2011. Food and addiction: implications and relevance to eating disorders and obesity. *Curr Drug Abuse Rev* 4, 131-132.
- Bach Knudsen, K.E., Serena, A., Canibe, N., Juntunen, K.S., 2003. New insight into butyrate metabolism. *Proc Nutr Soc* 62, 81-86.
- Badiani, A., Jakob, A., Rodaros, D., Stewart, J., 1996. Sensitization of stress-induced feeding in rats repeatedly exposed to brief restraint: the role of corticosterone. *Brain Res* 710, 35-44.
- Barbano, M.F., Cador, M., 2005. Various aspects of feeding behavior can be partially dissociated in the rat by the incentive properties of food and the physiological state. *Behav Neurosci* 119, 1244-1253.
- Barbano, M.F., Cador, M., 2006. Differential regulation of the consummatory, motivational and anticipatory aspects of feeding behavior by dopaminergic and opioidergic drugs. *Neuropsychopharmacology* 31, 1371-1381.
- Barbazanges, A., Vallee, M., Mayo, W., Day, J., Simon, H., Le Moal, M., Maccari, S., 1996. Early and later adoptions have different long-term effects on male rat offspring. *J Neurosci* 16, 7783-7790.
- Barker, D.J., Gluckman, P.D., Godfrey, K.M., Harding, J.E., Owens, J.A., Robinson, J.S., 1993a. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341, 938-941.
- Barker, D.J., Hales, C.N., Fall, C.H., Osmond, C., Phipps, K., Clark, P.M., 1993b. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36, 62-67.

- Barreau, F., Cartier, C., Ferrier, L., Fioramonti, J., Bueno, L., 2004a. Nerve growth factor mediates alterations of colonic sensitivity and mucosal barrier induced by neonatal stress in rats. *Gastroenterology* 127, 524-534.
- Barreau, F., Cartier, C., Leveque, M., Ferrier, L., Moriez, R., Laroute, V., Rosztoczy, A., Fioramonti, J., Bueno, L., 2007. Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. *J Physiol* 580, 347-356.
- Barreau, F., de Lahitte, J.D., Ferrier, L., Frexinos, J., Bueno, L., Fioramonti, J., 2006. Neonatal maternal deprivation promotes *Nippostrongylus brasiliensis* infection in adult rats. *Brain Behav Immun* 20, 254-260.
- Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J., Bueno, L., 2004b. Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* 53, 501-506.
- Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J., Bueno, L., 2004c. Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* 53, 501-506.
- Baudin, A., Blot, K., Verney, C., Estevez, L., Santamaria, J., Gressens, P., Giros, B., Otani, S., Dauge, V., Naudon, L., 2012. Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 98, 207-214.
- Bayol, S.A., Farrington, S.J., Stickland, N.C., 2007. A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br J Nutr* 98, 843-851.
- Bayol, S.A., Simbi, B.H., Stickland, N.C., 2005. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *J Physiol* 567, 951-961.
- Becker, H.C., 2013. Animal models of excessive alcohol consumption in rodents. *Curr Top Behav Neurosci* 13, 355-377.
- Bell, M.E., Bhargava, A., Soriano, L., Laugero, K., Akana, S.F., Dallman, M.F., 2002. Sucrose intake and corticosterone interact with cold to modulate ingestive behaviour, energy balance, autonomic outflow and neuroendocrine responses during chronic stress. *J Neuroendocrinol* 14, 330-342.
- Ben Abdallah, N.M., Slomianka, L., Vyssotski, A.L., Lipp, H.P., 2010. Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiol Aging* 31, 151-161.
- Ben Achour, S., Pascual, O., 2012. Astrocyte-neuron communication: functional consequences. *Neurochem Res* 37, 2464-2473.
- Bernard, J.Y., De Agostini, M., Forhan, A., de Lauzon-Guillain, B., Charles, M.A., Heude, B., 2013. The dietary n6:n3 fatty acid ratio during pregnancy is inversely associated with child neurodevelopment in the EDEN mother-child cohort. *J Nutr* 143, 1481-1488.
- Bernardi, J.R., Ferreira, C.F., Senter, G., Krolow, R., de Aguiar, B.W., Portella, A.K., Kauer-Sant'anna, M., Kapczinski, F., Dalmaz, C., Goldani, M.Z., Silveira, P.P., 2013. Early life stress interacts with the diet deficiency of omega-3 fatty acids during the

- life course increasing the metabolic vulnerability in adult rats. *PLoS One* 8, e62031.
- Berridge, K.C., Robinson, T.E., Aldridge, J.W., 2009. Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Curr Opin Pharmacol* 9, 65-73.
- Berry, R., Sellman, J.D., 2001. Childhood adversity in alcohol- and drug-dependent women presenting to out-patient treatment. *Drug and Alcohol Review* 20, 361-367.
- Berthoud, H.R., 2011. Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? *Curr Opin Neurobiol* 21, 888-896.
- Bertino, M., 1982. Effects of high fat, protein supplemented diets on maternal behavior in rats. *Physiol Behav* 29, 999-1005.
- Bhatnagar, S., Taneja, S., 2001. Zinc and cognitive development. *Br J Nutr* 85 Suppl 2, S139-145.
- Biagini, G., Pich, E.M., Carani, C., Marrama, P., Agnati, L.F., 1998. Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *Int J Dev Neurosci* 16, 187-197.
- Bilbo, S.D., Tsang, V., 2010. Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. *FASEB J* 24, 2104-2115.
- Blasbalg, T.L., Hibbeln, J.R., Ramsden, C.E., Majchrzak, S.F., Rawlings, R.R., 2011. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am J Clin Nutr* 93, 950-962.
- Blinder, B.J., Cumella, E.J., Sanathara, V.A., 2006. Psychiatric comorbidities of female inpatients with eating disorders. *Psychosom Med* 68, 454-462.
- Boccia, M.L., Razzoli, M., Vadlamudi, S.P., Trumbull, W., Caleffie, C., Pedersen, C.A., 2007. Repeated long separations from pups produce depression-like behavior in rat mothers. *Psychoneuroendocrinology* 32, 65-71.
- Boersma, G.J., Bale, T.L., Casanello, P., Lara, H.E., Lucion, A.B., Suchecki, D., Tamashiro, K.L., 2014. Long-term impact of early life events on physiology and behaviour. *J Neuroendocrinol* 26, 587-602.
- Boitard, C., Cavaroc, A., Sauviant, J., Aubert, A., Castanon, N., Laye, S., Ferreira, G., 2014. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav Immun* 40, 9-17.
- Boitard, C., Etchamendy, N., Sauviant, J., Aubert, A., Tronel, S., Marighetto, A., Laye, S., Ferreira, G., 2012. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 22, 2095-2100.
- Borghol, N., Suderman, M., McArdle, W., Racine, A., Hallett, M., Pembrey, M., Hertzman, C., Power, C., Szyf, M., 2012. Associations with early-life socio-economic position in adult DNA methylation. *Int J Epidemiol* 41, 62-74.
- Bouanane, S., Benkalfat, N.B., Baba Ahmed, F.Z., Merzouk, H., Mokhtari, N.S., Merzouk, S.A., Gresti, J., Tessier, C., Narce, M., 2009. Time course of changes in serum

- oxidant/antioxidant status in overfed obese rats and their offspring. *Clin Sci (Lond)* 116, 669-680.
- Bradford, K., Shih, W., Videlock, E.J., Presson, A.P., Naliboff, B.D., Mayer, E.A., Chang, L., 2012. Association between early adverse life events and irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10, 385-390 e381-383.
- Brake, W.G., Zhang, T.Y., Diorio, J., Meaney, M.J., Gratton, A., 2004. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci* 19, 1863-1874.
- Braun, D.L., Sunday, S.R., Halmi, K.A., 1994. Psychiatric comorbidity in patients with eating disorders. *Psychol Med* 24, 859-867.
- Bravo, J.A., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2014. Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT<sub>1A</sub> receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain. *Front Mol Neurosci* 7, 24.
- Bruce, K.D., Hanson, M.A., 2010. The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. *J Nutr* 140, 648-652.
- Buchenauer, T., Behrendt, P., Bode, F.J., Horn, R., Brabant, G., Stephan, M., Nave, H., 2009. Diet-induced obesity alters behavior as well as serum levels of corticosterone in F344 rats. *Physiol Behav* 98, 563-569.
- Burton, C.L., Chatterjee, D., Chatterjee-Chakraborty, M., Lovic, V., Grella, S.L., Steiner, M., Fleming, A.S., 2007. Prenatal restraint stress and motherless rearing disrupts expression of plasticity markers and stress-induced corticosterone release in adult female Sprague-Dawley rats. *Brain Res* 1158, 28-38.
- Caldji, C., Diorio, J., Meaney, M.J., 2000. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol Psychiatry* 48, 1164-1174.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1998. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5335-5340.
- Cameron, N.M., Champagne, F.A., Parent, C., Fish, E.W., Ozaki-Kuroda, K., Meaney, M.J., 2005. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 843-865.
- Cao, X., Huang, S., Cao, J., Chen, T., Zhu, P., Zhu, R., Su, P., Ruan, D., 2014. The timing of maternal separation affects morris water maze performance and long-term potentiation in male rats. *Dev Psychobiol* 56, 1102-1109.
- Capuron, L., Ravaud, A., Miller, A.H., Dantzer, R., 2004. Baseline mood and psychosocial characteristics of patients developing depressive symptoms during interleukin-2 and/or interferon-alpha cancer therapy. *Brain Behav Immun* 18, 205-213.
- Carlin, J., George, R., Reyes, T.M., 2013a. Methyl donor supplementation blocks the adverse effects of maternal high fat diet on offspring physiology. *PLoS One* 8, e63549.
- Carlin, J., Hill-Smith, T.E., Lucki, I., Reyes, T.M., 2013b. Reversal of dopamine system dysfunction in response to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 21, 2513-2521.

- Carlson, M., Earls, F., 1997. Psychological and neuroendocrinological sequelae of early social deprivation in institutionalized children in Romania. *Ann N Y Acad Sci* 807, 419-428.
- Carpenter, L.L., Gawuga, C.E., Tyrka, A.R., Lee, J.K., Anderson, G.M., Price, L.H., 2010. Association between plasma IL-6 response to acute stress and early-life adversity in healthy adults. *Neuropsychopharmacology* 35, 2617-2623.
- Carpenter, L.L., Ross, N.S., Tyrka, A.R., Anderson, G.M., Kelly, M., Price, L.H., 2009a. Dex/CRH test cortisol response in outpatients with major depression and matched healthy controls. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1208-1213.
- Carpenter, L.L., Tyrka, A.R., Ross, N.S., Khoury, L., Anderson, G.M., Price, L.H., 2009b. Effect of childhood emotional abuse and age on cortisol responsivity in adulthood. *Biol Psychiatry* 66, 69-75.
- Carrion, V.G., Weems, C.F., Ray, R.D., Glaser, B., Hessel, D., Reiss, A.L., 2002. Diurnal salivary cortisol in pediatric posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 51, 575-582.
- Carrion, V.G., Weems, C.F., Watson, C., Eliez, S., Menon, V., Reiss, A.L., 2009. Converging evidence for abnormalities of the prefrontal cortex and evaluation of midsagittal structures in pediatric posttraumatic stress disorder: an MRI study. *Psychiatry Res* 172, 226-234.
- Carroll, J.E., Cohen, S., Marsland, A.L., 2011. Early childhood socioeconomic status is associated with circulating interleukin-6 among mid-life adults. *Brain Behav Immun* 25, 1468-1474.
- Champagne, F.A., Francis, D.D., Mar, A., Meaney, M.J., 2003a. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav* 79, 359-371.
- Champagne, F.A., Weaver, I.C., Diorio, J., Sharma, S., Meaney, M.J., 2003b. Natural variations in maternal care are associated with estrogen receptor alpha expression and estrogen sensitivity in the medial preoptic area. *Endocrinology* 144, 4720-4724.
- Chapillon, P., Patin, V., Roy, V., Vincent, A., Caston, J., 2002. Effects of pre- and postnatal stimulation on developmental, emotional, and cognitive aspects in rodents: a review. *Dev Psychobiol* 41, 373-387.
- Chapman, D.P., Whitfield, C.L., Felitti, V.J., Dube, S.R., Edwards, V.J., Anda, R.F., 2004. Adverse childhood experiences and the risk of depressive disorders in adulthood. *J Affect Disord* 82, 217-225.
- Chen, H., Simar, D., Morris, M.J., 2009. Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: interaction with postnatal nutritional environment. *PLoS One* 4, e6259.
- Chitkara, D.K., van Tilburg, M.A., Blois-Martin, N., Whitehead, W.E., 2008. Early life risk factors that contribute to irritable bowel syndrome in adults: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 103, 765-774; quiz 775.
- Chocyk, A., Bobula, B., Dudys, D., Przyborowska, A., Majcher-Maslanka, I., Hess, G., Wedzony, K., 2013. Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *Eur J Neurosci* 38, 2089-2107.

- Choeiri, C., Hewitt, K., Durkin, J., Simard, C.J., Renaud, J.M., Messier, C., 2005. Longitudinal evaluation of memory performance and peripheral neuropathy in the Ins2C96Y Akita mice. *Behav Brain Res* 157, 31-38.
- Choi, S.W., Friso, S., 2010. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Adv Nutr* 1, 8-16.
- Chugani, H.T., Behen, M.E., Muzik, O., Juhasz, C., Nagy, F., Chugani, D.C., 2001. Local brain functional activity following early deprivation: a study of postinstitutionalized Romanian orphans. *Neuroimage* 14, 1290-1301.
- Cicchetti, D., Rogosch, F.A., 2001. Diverse patterns of neuroendocrine activity in maltreated children. *Dev Psychopathol* 13, 677-693.
- Cirulli, F., Alleva, E., Antonelli, A., Aloe, L., 2000. NGF expression in the developing rat brain: effects of maternal separation. *Brain Res Dev Brain Res* 123, 129-134.
- Cirulli, F., Berry, A., Alleva, E., 2003. Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev* 27, 73-82.
- Cleobury, L., Tapper, K., 2014. Reasons for eating 'unhealthy' snacks in overweight and obese males and females. *J Hum Nutr Diet* 27, 333-341.
- Connor, W.E., Neuringer, M., Lin, D.S., 1990. Dietary effects on brain fatty acid composition: the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes, and plasma of rhesus monkeys. *J Lipid Res* 31, 237-247.
- Conroy, E., Degenhardt, L., Mattick, R.P., Nelson, E.C., 2009. Child maltreatment as a risk factor for opioid dependence: Comparison of family characteristics and type and severity of child maltreatment with a matched control group. *Child Abuse Negl* 33, 343-352.
- Corcos, M., Guilbaud, O., Paterniti, S., Moussa, M., Chambry, J., Chaouat, G., Consoli, S.M., Jeammet, P., 2003. Involvement of cytokines in eating disorders: a critical review of the human literature. *Psychoneuroendocrinology* 28, 229-249.
- Cordain, L., Eaton, S.B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B.A., O'Keefe, J.H., Brand-Miller, J., 2005. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 81, 341-354.
- Cotella, E.M., Mestres Lascano, I., Franchioni, L., Levin, G.M., Suarez, M.M., 2013. Long-term effects of maternal separation on chronic stress response suppressed by amitriptyline treatment. *Stress* 16, 477-481.
- Coupe, B., Amarger, V., Grit, I., Benani, A., Parnet, P., 2010. Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology* 151, 702-713.
- Coutinho, S.V., Plotsky, P.M., Sablad, M., Miller, J.C., Zhou, H., Bayati, A.I., McRoberts, J.A., Mayer, E.A., 2002. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, G307-316.
- Couvreux, O., Ferezou, J., Grippo, D., Serougne, C., Crepin, D., Aubourg, A., Gertler, A., Vacher, C.M., Taouis, M., 2011. Unexpected long-term protection of adult

- offspring born to high-fat fed dams against obesity induced by a sucrose-rich diet. *PLoS One* 6, e18043.
- Curley, J.P., Jensen, C.L., Franks, B., Champagne, F.A., 2012. Variation in maternal and anxiety-like behavior associated with discrete patterns of oxytocin and vasopressin 1a receptor density in the lateral septum. *Horm Behav* 61, 454-461.
- D'Argenio, A., Mazzi, C., Pecchioli, L., Di Lorenzo, G., Siracusano, A., Troisi, A., 2009. Early trauma and adult obesity: is psychological dysfunction the mediating mechanism? *Physiol Behav* 98, 543-546.
- da Silva, M.C., de Souza, J.A., Dos Santos, L.O., Pinheiro, I.L., Borba, T.K., da Silva, A.A., de Castro, R.M., de Souza, S.L., 2014. Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats. *J Dev Orig Health Dis* 5, 219-228.
- Dallman, M.F., Akana, S.F., Levin, N., Walker, C.D., Bradbury, M.J., Suemaru, S., Scribner, K.S., 1994. Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Ann N Y Acad Sci* 746, 22-31; discussion 31-22, 64-27.
- Dallman, M.F., Pecoraro, N., Akana, S.F., La Fleur, S.E., Gomez, F., Houshyar, H., Bell, M.E., Bhatnagar, S., Laugero, K.D., Manalo, S., 2003. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11696-11701.
- Danese, A., Moffitt, T.E., Pariante, C.M., Ambler, A., Poulton, R., Caspi, A., 2008. Elevated inflammation levels in depressed adults with a history of childhood maltreatment. *Arch Gen Psychiatry* 65, 409-415.
- Danese, A., Pariante, C.M., Caspi, A., Taylor, A., Poulton, R., 2007. Childhood maltreatment predicts adult inflammation in a life-course study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1319-1324.
- Daniels, W.M., Pietersen, C.Y., Carstens, M.E., Stein, D.J., 2004. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab Brain Dis* 19, 3-14.
- Darling, J.N., Ross, A.P., Bartness, T.J., Parent, M.B., 2013. Predicting the effects of a high-energy diet on fatty liver and hippocampal-dependent memory in male rats. *Obesity (Silver Spring)* 21, 910-917.
- Darnaudery, M., Perez-Martin, M., Del Favero, F., Gomez-Roldan, C., Garcia-Segura, L.M., Maccari, S., 2007. Early motherhood in rats is associated with a modification of hippocampal function. *Psychoneuroendocrinology* 32, 803-812.
- Daubert, E.A., Condron, B.G., 2010. Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends Neurosci* 33, 424-434.
- Dauncey, M.J., 2013. Genomic and epigenomic insights into nutrition and brain disorders. *Nutrients* 5, 887-914.
- Davidowa, H., Li, Y., Plagemann, A., 2003. Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic (alpha-MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats. *Eur J Neurosci* 18, 613-621.



- Davidowa, H., Plagemann, A., 2000. Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. *Neuroreport* 11, 2795-2798.
- Davidowa, H., Plagemann, A., 2007. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. *Neuroreport* 18, 521-524.
- Davidson, T.L., Monnot, A., Neal, A.U., Martin, A.A., Horton, J.J., Zheng, W., 2012. The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. *Physiol Behav* 107, 26-33.
- De Bellis, M.D., Baum, A.S., Birmaher, B., Keshavan, M.S., Eccard, C.H., Boring, A.M., Jenkins, F.J., Ryan, N.D., 1999. A.E. Bennett Research Award. Developmental traumatology. Part I: Biological stress systems. *Biol Psychiatry* 45, 1259-1270.
- De Bellis, M.D., Hall, J., Boring, A.M., Frustaci, K., Moritz, G., 2001. A pilot longitudinal study of hippocampal volumes in pediatric maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 50, 305-309.
- De Bellis, M.D., Keshavan, M.S., Shifflett, H., Iyengar, S., Beers, S.R., Hall, J., Moritz, G., 2002. Brain structures in pediatric maltreatment-related posttraumatic stress disorder: a sociodemographically matched study. *Biol Psychiatry* 52, 1066-1078.
- de Kloet, E.R., Joels, M., Oitzl, M., Sutanto, W., 1991. Implication of brain corticosteroid receptor diversity for the adaptation syndrome concept. *Methods Achiev Exp Pathol* 14, 104-132.
- de Lima, M.N., Presti-Torres, J., Vedana, G., Alcalde, L.A., Stertz, L., Fries, G.R., Roesler, R., Andersen, M.L., Quevedo, J., Kapczinski, F., Schroder, N., 2011. Early life stress decreases hippocampal BDNF content and exacerbates recognition memory deficits induced by repeated D-amphetamine exposure. *Behav Brain Res* 224, 100-106.
- de Souza, A.S., Fernandes, F.S., do Carmo, M., 2011. Effects of maternal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on brain fatty acids, learning, and memory. *Nutr Rev* 69, 132-144.
- Denenberg, V.H., 1999. Commentary: is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy? *Dev Psychobiol* 34, 1-3.
- Denenberg, V.H., Ottinger, D.R., Stephens, M.W., 1962. Effects of maternal factors upon growth and behavior of the rat. *Child Dev* 33, 65-71.
- Deroche-Gamonet, V., Belin, D., Piazza, P.V., 2004. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* 305, 1014-1017.
- Diane, A., Victoriano, M., Fromentin, G., Tome, D., Larue-Achagiotis, C., 2008. Acute stress modifies food choice in Wistar male and female rats. *Appetite* 50, 397-407.
- Dinan, T.G., Quigley, E.M., Ahmed, S.M., Scully, P., O'Brien, S., O'Mahony, L., O'Mahony, S., Shanahan, F., Keeling, P.W., 2006. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology* 130, 304-311.

- Diorio, D., Viau, V., Meaney, M.J., 1993. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci* 13, 3839-3847.
- Dong, M., Anda, R.F., Felitti, V.J., Dube, S.R., Williamson, D.F., Thompson, T.J., Loo, C.M., Giles, W.H., 2004. The interrelatedness of multiple forms of childhood abuse, neglect, and household dysfunction. *Child Abuse Negl* 28, 771-784.
- Drewnowski, A., 2004. Obesity and the food environment: dietary energy density and diet costs. *Am J Prev Med* 27, 154-162.
- Drewnowski, A., Darmon, N., 2005. Food choices and diet costs: an economic analysis. *J Nutr* 135, 900-904.
- Drewnowski, A., Henderson, S.A., Shore, A.B., Fischler, C., Preziosi, P., Hercberg, S., 1996. Diet quality and dietary diversity in France: implications for the French paradox. *J Am Diet Assoc* 96, 663-669.
- Drewnowski, A., Rolls, B.J., 2005. How to modify the food environment. *J Nutr* 135, 898-899.
- Driessen, M., Herrmann, J., Stahl, K., Zwaan, M., Meier, S., Hill, A., Osterheider, M., Petersen, D., 2000. Magnetic resonance imaging volumes of the hippocampus and the amygdala in women with borderline personality disorder and early traumatization. *Arch Gen Psychiatry* 57, 1115-1122.
- Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., Piazza, P.V., 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3, e1959.
- Edwards, H.E., Burnham, W.M., 2001. The impact of corticosteroids on the developing animal. *Pediatric Research* 50, 433-440.
- Egecioglu, E., Skibicka, K.P., Hansson, C., Alvarez-Crespo, M., Friberg, P.A., Jerlhag, E., Engel, J.A., Dickson, S.L., 2011. Hedonic and incentive signals for body weight control. *Rev Endocr Metab Disord* 12, 141-151.
- Eiland, L., McEwen, B.S., 2012. Early life stress followed by subsequent adult chronic stress potentiates anxiety and blunts hippocampal structural remodeling. *Hippocampus* 22, 82-91.
- Elahi, M.M., Cagampang, F.R., Mukhtar, D., Anthony, F.W., Ohri, S.K., Hanson, M.A., 2009. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *Br J Nutr* 102, 514-519.
- Ely, D.R., Dapper, V., Marasca, J., Correa, J.B., Gamaro, G.D., Xavier, M.H., Michalowski, M.B., Catelli, D., Rosat, R., Ferreira, M.B., Dalmaz, C., 1997. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav* 61, 395-398.
- Epel, E.S., McEwen, B., Seeman, T., Matthews, K., Castellazzo, G., Brownell, K.D., Bell, J., Ickovics, J.R., 2000. Stress and body shape: Stress-induced cortisol secretion is consistently greater among women with central fat. *Psychosomatic Medicine* 62, 623-632.
- Essex, M.J., Boyce, W.T., Hertzman, C., Lam, L.L., Armstrong, J.M., Neumann, S.M., Kobor, M.S., 2013. Epigenetic vestiges of early developmental adversity: childhood stress exposure and DNA methylation in adolescence. *Child Dev* 84, 58-75.

- Famularo, R., Kinscherff, R., Fenton, T., 1992. Psychiatric diagnoses of abusive mothers. A preliminary report. *J Nerv Ment Dis* 180, 658-661.
- Farkas, J., Reglodi, D., Gaszner, B., Szogyi, D., Horvath, G., Lubics, A., Tamas, A., Frank, F., Besirevic, D., Kiss, P., 2009. Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. *Brain Res Bull* 79, 208-214.
- Farr, S.A., Yamada, K.A., Butterfield, D.A., Abdul, H.M., Xu, L., Miller, N.E., Banks, W.A., Morley, J.E., 2008. Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* 149, 2628-2636.
- Felitti, V.J., Anda, R.F., Nordenberg, D., Williamson, D.F., Spitz, A.M., Edwards, V., Koss, M.P., Marks, J.S., 1998. Relationship of childhood abuse and household dysfunction to many of the leading causes of death in adults. The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study. *Am J Prev Med* 14, 245-258.
- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S.L., Le, T., Li, E., Sweatt, J.D., Silva, A.J., Fan, G., 2010. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci* 13, 423-430.
- Feng, M., Sheng, G., Li, Z., Wang, J., Ren, K., Jin, X., Jiang, K., 2014. Postnatal maternal separation enhances tonic GABA current of cortical layer 5 pyramidal neurons in juvenile rats and promotes genesis of GABAergic neurons in neocortical molecular layer and subventricular zone in adult rats. *Behav Brain Res* 260, 74-82.
- Ferezou-Viala, J., Roy, A.F., Serougne, C., Gripois, D., Parquet, M., Bailleux, V., Gertler, A., Delplanque, B., Djiane, J., Riottot, M., Taouis, M., 2007. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R1056-1062.
- Ferguson, G.D., Anagnostaras, S.G., Silva, A.J., Herschman, H.R., 2000. Deficits in memory and motor performance in synaptotagmin IV mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5598-5603.
- Ferguson, G.D., Wang, H., Herschman, H.R., Storm, D.R., 2004. Altered hippocampal short-term plasticity and associative memory in synaptotagmin IV (-/-) mice. *Hippocampus* 14, 964-974.
- Finger, B.C., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2011. High-fat diet selectively protects against the effects of chronic social stress in the mouse. *Neuroscience* 192, 351-360.
- Finlayson, G., Dalton, M., 2012. Current progress in the assessment of 'liking' vs. 'wanting' food in human appetite. Comment on "'You say it's liking, i say it's wanting...". On the difficulty of disentangling food reward in man'. *Appetite* 58, 373-378; discussion 252-375.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.
- Francis, D.D., Diorio, J., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 2002. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J Neurosci* 22, 7840-7843.
- Francis, D.D., Meaney, M.J., 1999. Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol* 9, 128-134.

- Frayn, K.N., 2001. Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. *Proc Nutr Soc* 60, 375-380.
- Frick, K.M., Fernandez, S.M., 2003. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging* 24, 615-626.
- Friemel, C.M., Spanagel, R., Schneider, M., 2010. Reward sensitivity for a palatable food reward peaks during pubertal developmental in rats. *Front Behav Neurosci* 4.
- Frodl, T., Reinhold, E., Koutsouleris, N., Donohoe, G., Bondy, B., Reiser, M., Moller, H.J., Meisenzahl, E.M., 2010. Childhood stress, serotonin transporter gene and brain structures in major depression. *Neuropsychopharmacology* 35, 1383-1390.
- Fulton, S., 2010. Appetite and reward. *Front Neuroendocrinol* 31, 85-103.
- Garcia-Rodenas, C.L., Bergonzelli, G.E., Nutton, S., Schumann, A., Cherbut, C., Turini, M., Ornstein, K., Rochat, F., Cortesy-Theulaz, I., 2006. Nutritional approach to restore impaired intestinal barrier function and growth after neonatal stress in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43, 16-24.
- Gareau, M.G., Jury, J., MacQueen, G., Sherman, P.M., Perdue, M.H., 2007. Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut* 56, 1522-1528.
- Gareau, M.G., Jury, J., Yang, P.C., MacQueen, G., Perdue, M.H., 2006. Neonatal maternal separation causes colonic dysfunction in rat pups including impaired host resistance. *Pediatr Res* 59, 83-88.
- Gil-Rivas, V., Fiorentine, R., Anglin, M.D., 1996. Sexual abuse, physical abuse, and posttraumatic stress disorder among women participating in outpatient drug abuse treatment. *J Psychoactive Drugs* 28, 95-102.
- Giriko, C.A., Andreoli, C.A., Mennitti, L.V., Hosoume, L.F., Souto Tdos, S., Silva, A.V., Mendes-da-Silva, C., 2013. Delayed physical and neurobehavioral development and increased aggressive and depression-like behaviors in the rat offspring of dams fed a high-fat diet. *Int J Dev Neurosci* 31, 731-739.
- Gladwin, T.E., Figner, B., Crone, E.A., Wiers, R.W., 2011. Addiction, adolescence, and the integration of control and motivation. *Dev Cogn Neurosci* 1, 364-376.
- Godart, N.T., Flament, M.F., Perdereau, F., Jeammet, P., 2002. Comorbidity between eating disorders and anxiety disorders: a review. *Int J Eat Disord* 32, 253-270.
- Gosselin, R.D., O'Connor, R.M., Tramullas, M., Julio-Pieper, M., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2010. Riluzole normalizes early-life stress-induced visceral hypersensitivity in rats: role of spinal glutamate reuptake mechanisms. *Gastroenterology* 138, 2418-2425.
- Gouin, J.P., Glaser, R., Malarkey, W.B., Beversdorf, D., Kiecolt-Glaser, J.K., 2012. Childhood abuse and inflammatory responses to daily stressors. *Ann Behav Med* 44, 287-292.
- Green, J.G., McLaughlin, K.A., Berglund, P.A., Gruber, M.J., Sampson, N.A., Zaslavsky, A.M., Kessler, R.C., 2010. Childhood adversities and adult psychiatric disorders in the national comorbidity survey replication I: associations with first onset of DSM-IV disorders. *Arch Gen Psychiatry* 67, 113-123.

- Green, P., Glozman, S., Kamensky, B., Yavin, E., 1999. Developmental changes in rat brain membrane lipids and fatty acids. The preferential prenatal accumulation of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* 40, 960-966.
- Greenfield, E.A., Marks, N.F., 2009. Violence from parents in childhood and obesity in adulthood: using food in response to stress as a mediator of risk. *Soc Sci Med* 68, 791-798.
- Greeno, C.G., Wing, R.R., 1994. Stress-induced eating. *Psychol Bull* 115, 444-464.
- Greenwood, C.E., Winocur, G., 1996. Cognitive impairment in rats fed high-fat diets: a specific effect of saturated fatty-acid intake. *Behav Neurosci* 110, 451-459.
- Greenwood, C.E., Winocur, G., 2005. High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. *Neurobiol Aging* 26 Suppl 1, 42-45.
- Gregorio, B.M., Souza-Mello, V., Carvalho, J.J., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Aguila, M.B., 2010. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am J Obstet Gynecol* 203, 495 e491-498.
- Greisen, M.H., Altar, C.A., Bolwig, T.G., Whitehead, R., Wortwein, G., 2005. Increased adult hippocampal brain-derived neurotrophic factor and normal levels of neurogenesis in maternal separation rats. *J Neurosci Res* 79, 772-778.
- Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S., Hen, R., 2002. Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416, 396-400.
- Gugusheff, J.R., Ong, Z.Y., Muhlhausler, B.S., 2013. A maternal "junk-food" diet reduces sensitivity to the opioid antagonist naloxone in offspring postweaning. *FASEB J* 27, 1275-1284.
- Gundersen, C., Mahatmya, D., Garasky, S., Lohman, B., 2011. Linking psychosocial stressors and childhood obesity. *Obes Rev* 12, e54-63.
- Gunstad, J., Paul, R.H., Spitznagel, M.B., Cohen, R.A., Williams, L.M., Kohn, M., Gordon, E., 2006. Exposure to early life trauma is associated with adult obesity. *Psychiatry Res* 142, 31-37.
- Gutman, D.A., Nemeroff, C.B., 2002. Neurobiology of early life stress: rodent studies. *Semin Clin Neuropsychiatry* 7, 89-95.
- Hales, C.N., Barker, D.J., Clark, P.M., Cox, L.J., Fall, C., Osmond, C., Winter, P.D., 1991. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 303, 1019-1022.
- Halland, M., Almazan, A., Lee, R., Atkinson, E., Larson, J., Talley, N.J., Saito, Y.A., 2014. A case-control study of childhood trauma in the development of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 26, 990-998.
- Haller, J., Harold, G., Sandi, C., Neumann, I.D., 2014. Effects of adverse early-life events on aggression and anti-social behaviours in animals and humans. *J Neuroendocrinol* 26, 724-738.
- Hammen, C., Davila, J., Brown, G., Ellicott, A., Gitlin, M., 1992. Psychiatric history and stress: predictors of severity of unipolar depression. *J Abnorm Psychol* 101, 45-52.
- Harbeby, E., Jouin, M., Alessandri, J.M., Lallemand, M.S., Linard, A., Lavialle, M., Huertas, A., Cunnane, S.C., Guesnet, P., 2012. n-3 PUFA status affects expression of genes

involved in neuroenergetics differently in the fronto-parietal cortex compared to the CA1 area of the hippocampus: effect of rest and neuronal activation in the rat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 86, 211-220.

- Harris, R.B., Mitchell, T.D., Simpson, J., Redmann, S.M., Jr., Youngblood, B.D., Ryan, D.H., 2002. Weight loss in rats exposed to repeated acute restraint stress is independent of energy or leptin status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R77-88.
- Harrison, P.A., Hoffmann, N.G., Edwall, G.E., 1989. Differential drug use patterns among sexually abused adolescent girls in treatment for chemical dependency. *Int J Addict* 24, 499-514.
- Hart, J., Gunnar, M., Cicchetti, D., 1996. Altered neuroendocrine activity in maltreated children related to symptoms of depression. *Development and Psychopathology* 8, 201-214.
- Hays, S.L., McPherson, R.J., Juul, S.E., Wallace, G., Schindler, A.G., Chavkin, C., Gleason, C.A., 2012. Long-term effects of neonatal stress on adult conditioned place preference (CPP) and hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res* 227, 7-11.
- Heim, C., Mletzko, T., Purselle, D., Musselman, D.L., Nemeroff, C.B., 2008. The dexamethasone/corticotropin-releasing factor test in men with major depression: role of childhood trauma. *Biol Psychiatry* 63, 398-405.
- Heim, C., Nemeroff, C.B., 2001. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49, 1023-1039.
- Heim, C., Newport, D.J., Heit, S., Graham, Y.P., Wilcox, M., Bonsall, R., Miller, A.H., Nemeroff, C.B., 2000. Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood. *JAMA* 284, 592-597.
- Heiman, M.L., Ahima, R.S., Craft, L.S., Schoner, B., Stephens, T.W., Flier, J.S., 1997. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology* 138, 3859-3863.
- Hislop, I.G., 1979. Childhood deprivation: an antecedent of the irritable bowel syndrome. *Med J Aust* 1, 372-374.
- Hofer, M.A., 2001. Mother Nature: A History of Mothers, Infants and Natural Selection. *Parent-Sci Pract* 1, 153-158.
- Hofer, M.A., Shair, H., 1978. Ultrasonic vocalization during social interaction and isolation in 2-week-old rats. *Dev Psychobiol* 11, 495-504.
- Hofer, M.A., Shair, H., 1982. Control of Sleep Wake States in the Infant Rat by Features of the Mother Infant Relationship. *Developmental Psychobiology* 15, 229-243.
- Hone-Blanchet, A., Fecteau, S., 2014. Overlap of food addiction and substance use disorders definitions: Analysis of animal and human studies. *Neuropharmacology* 85C, 81-90.
- Horesh, N., Apter, A., Ishai, J., Danziger, Y., Miculincer, M., Stein, D., Lepkifker, E., Minouni, M., 1996. Abnormal psychosocial situations and eating disorders in adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35, 921-927.

- Horesh, N., Apter, A., Lepkifker, E., Ratzoni, G., Weizmann, R., Tyano, S., 1995. Life events and severe anorexia nervosa in adolescence. *Acta Psychiatr Scand* 91, 5-9.
- Howie, G.J., Sloboda, D.M., Kamal, T., Vickers, M.H., 2009. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol* 587, 905-915.
- Hulshof, H.J., Novati, A., Luiten, P.G., den Boer, J.A., Meerlo, P., 2012. Despite higher glucocorticoid levels and stress responses in female rats, both sexes exhibit similar stress-induced changes in hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res* 234, 357-364.
- Hulshof, H.J., Novati, A., Sgoifo, A., Luiten, P.G., den Boer, J.A., Meerlo, P., 2011. Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behav Brain Res* 216, 552-560.
- Huot, R.L., Gonzalez, M.E., Ladd, C.O., Thirivikraman, K.V., Plotsky, P.M., 2004. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology* 29, 279-289.
- Huot, R.L., Plotsky, P.M., Lenox, R.H., McNamara, R.K., 2002. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res* 950, 52-63.
- Huot, R.L., Thirivikraman, K.V., Meaney, M.J., Plotsky, P.M., 2001. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 158, 366-373.
- Iwasaki, S., Inoue, K., Kiriike, N., Hikiji, K., 2000. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. *Physiol Behav* 70, 551-556.
- Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Jaworski, J.N., Francis, D.D., Brommer, C.L., Morgan, E.T., Kuhar, M.J., 2005. Effects of early maternal separation on ethanol intake, GABA receptors and metabolizing enzymes in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)* 181, 8-15.
- Jump, D.B., 2002. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol* 13, 155-164.
- Kalinichev, M., Easterling, K.W., Holtzman, S.G., 2002a. Early neonatal experience of Long-Evans rats results in long-lasting changes in reactivity to a novel environment and morphine-induced sensitization and tolerance. *Neuropsychopharmacology* 27, 518-533.
- Kalinichev, M., Easterling, K.W., Plotsky, P.M., Holtzman, S.G., 2002b. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73, 131-140.
- Kamara, K., Eskay, R., Castonguay, T., 1998. High-fat diets and stress responsivity. *Physiol Behav* 64, 1-6.

- Kandiah, J., Yake, M., Jones, J., Meyer, M., 2006. Stress influences appetite and comfort food preferences in college women. *Nutrition Research* 26, 118-123.
- Kaufman, J., 1991. Depressive disorders in maltreated children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 30, 257-265.
- Kaufman, J., Birmaher, B., Perel, J., Dahl, R.E., Moreci, P., Nelson, B., Wells, W., Ryan, N.D., 1997. The corticotropin-releasing hormone challenge in depressed abused, depressed nonabused, and normal control children. *Biol Psychiatry* 42, 669-679.
- Kearney, J., 2010. Food consumption trends and drivers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 2793-2807.
- Kendler, K.S., Neale, M.C., Kessler, R.C., Heath, A.C., Eaves, L.J., 1992. Childhood parental loss and adult psychopathology in women. A twin study perspective. *Arch Gen Psychiatry* 49, 109-116.
- Khan, I., Dekou, V., Hanson, M., Poston, L., Taylor, P., 2004. Predictive adaptive responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring. *Circulation* 110, 1097-1102.
- Kikusui, T., Faccidomo, S., Miczek, K.A., 2005. Repeated maternal separation: differences in cocaine-induced behavioral sensitization in adult male and female mice. *Psychopharmacology (Berl)* 178, 202-210.
- Kim, D.Y., Camilleri, M., 2000. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterol* 95, 2698-2709.
- Kim, H.J., Lee, J.H., Choi, S.H., Lee, Y.S., Jahng, J.W., 2005. Fasting-induced increases of arcuate NPY mRNA and plasma corticosterone are blunted in the rat experienced neonatal maternal separation. *Neuropeptides* 39, 587-594.
- King, R.S., DeBassio, W.A., Kemper, T.L., Rosene, D.L., Tonkiss, J., Galler, J.R., Blatt, G.J., 2004. Effects of prenatal protein malnutrition and acute postnatal stress on granule cell genesis in the fascia dentata of neonatal and juvenile rats. *Dev Brain Res* 150, 9-15.
- King, V., Norman, J.E., Seckl, J.R., Drake, A.J., 2014. Post-weaning diet determines metabolic risk in mice exposed to overnutrition in early life. *Reprod Biol Endocrinol* 12, 73.
- Kinzig, K.P., Hargrave, S.L., Honors, M.A., 2008. Binge-type eating attenuates corticosterone and hypophagic responses to restraint stress. *Physiol Behav* 95, 108-113.
- Kirk, S.L., Samuelsson, A.M., Argenton, M., Dhonye, H., Kalamatianos, T., Poston, L., Taylor, P.D., Coen, C.W., 2009. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One* 4, e5870.
- Kosten, T.A., Karanian, D.A., Yeh, J., Haile, C.N., Kim, J.J., Kehoe, P., Bahr, B.A., 2007. Memory impairments and hippocampal modifications in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Neurobiol Learn Mem* 88, 167-176.
- Kosten, T.A., Kim, J.J., Lee, H.J., 2012. Early life manipulations alter learning and memory in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 36, 1985-2006.



- Kosten, T.A., Zhang, X.Y., Kehoe, P., 2005. Neurochemical and behavioral responses to cocaine in adult male rats with neonatal isolation experience. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 661-667.
- Kris-Etherton, P.M., Taylor, D.S., Yu-Poth, S., Huth, P., Moriarty, K., Fishell, V., Hargrove, R.L., Zhao, G.X., Etherton, T.D., 2000. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition* 71, 179s-188s.
- Krolow, R., Noschang, C.G., Arcego, D., Andreazza, A.C., Peres, W., Goncalves, C.A., Dalmaz, C., 2010. Consumption of a palatable diet by chronically stressed rats prevents effects on anxiety-like behavior but increases oxidative stress in a sex-specific manner. *Appetite* 55, 108-116.
- Kruse, M., Seki, Y., Vuguin, P.M., Du, X.Q., Fiallo, A., Glenn, A.S., Singer, S., Breuhahn, K., Katz, E.B., Charron, M.J., 2013. High-fat intake during pregnancy and lactation exacerbates high-fat diet-induced complications in male offspring in mice. *Endocrinology* 154, 3565-3576.
- Kuma, H., Miki, T., Matsumoto, Y., Gu, H., Li, H.P., Kusaka, T., Satriotomo, I., Okamoto, H., Yokoyama, T., Bedi, K.S., Onishi, S., Suwaki, H., Takeuchi, Y., 2004. Early maternal deprivation induces alterations in brain-derived neurotrophic factor expression in the developing rat hippocampus. *Neurosci Lett* 372, 68-73.
- la Fleur, S.E., Houshyar, H., Roy, M., Dallman, M.F., 2005. Choice of lard, but not total lard calories, damps adrenocorticotropin responses to restraint. *Endocrinology* 146, 2193-2199.
- la Fleur, S.E., Vanderschuren, L.J., Luijendijk, M.C., Kloeze, B.M., Tiesjema, B., Adan, R.A., 2007. A reciprocal interaction between food-motivated behavior and diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* 31, 1286-1294.
- Labrousse, V.F., Nadjar, A., Joffre, C., Costes, L., Aubert, A., Gregoire, S., Bretillon, L., Laye, S., 2012. Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS One* 7, e36861.
- Ladd, C.O., Huot, R.L., Thrivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Meaney, M.J., Plotsky, P.M., 2000. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res* 122, 81-103.
- Ladd, C.O., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 1996. Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. *Endocrinology* 137, 1212-1218.
- Laitinen, J., Ek, E., Sovio, U., 2002. Stress-related eating and drinking behavior and body mass index and predictors of this behavior. *Preventive Medicine* 34, 29-39.
- Lambas-Senas, L., Mnie-Filali, O., Certin, V., Faure, C., Lemoine, L., Zimmer, L., Haddjeri, N., 2009. Functional correlates for 5-HT(1A) receptors in maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behaviors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33, 262-268.
- Lasselin, J., Magne, E., Beau, C., Ledaguenel, P., Dexpert, S., Aubert, A., Laye, S., Capuron, L., 2014. Adipose inflammation in obesity: relationship with circulating levels of inflammatory markers and association with surgery-induced weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 99, E53-61.

- Laye, S., 2010. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82, 295-303.
- Lee, J.H., Kim, H.J., Kim, J.G., Ryu, V., Kim, B.T., Kang, D.W., Jahng, J.W., 2007. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res* 58, 32-39.
- Legendre, A., Harris, R.B., 2006. Exaggerated response to mild stress in rats fed high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291, R1288-1294.
- Lehmann, J., Feldon, J., 2000. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev Neurosci* 11, 383-408.
- Lehmann, J., Pryce, C.R., Jongen-Relo, A.L., Stohr, T., Pothuizen, H.H., Feldon, J., 2002. Comparison of maternal separation and early handling in terms of their neurobehavioral effects in aged rats. *Neurobiol Aging* 23, 457-466.
- Lejeune, S., Dourmap, N., Martres, M.P., Giros, B., Dauge, V., Naudon, L., 2013. The dopamine D1 receptor agonist SKF 38393 improves temporal order memory performance in maternally deprived rats. *Neurobiol Learn Mem* 106, 268-273.
- Leon Rodriguez, D.A., Duenas, Z., 2013. Maternal Separation during Breastfeeding Induces Gender-Dependent Changes in Anxiety and the GABA-A Receptor Alpha-Subunit in Adult Wistar Rats. *PLoS One* 8, e68010.
- Levin, B.E., 2006. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1107-1121.
- Levine, S., 1966. Infantile stimulation and adaptation to stress. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 43, 280-291.
- Levine, S., 2005. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30, 939-946.
- Liang, C., Oest, M.E., Prater, M.R., 2009. Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult-onset chronic diseases in C57BL/6 mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 86, 377-384.
- Licciardi, P.V., Ververis, K., Karagiannis, T.C., 2011. Histone deacetylase inhibition and dietary short-chain Fatty acids. *ISRN Allergy* 2011, 869647.
- Lindqvist, A., Mohapel, P., Bouter, B., Frielingsdorf, H., Pizzo, D., Brundin, P., Erlanson-Albertsson, C., 2006. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur J Neurol* 13, 1385-1388.
- Lippmann, M., Bress, A., Nemeroff, C.B., Plotsky, P.M., Monteggia, L.M., 2007. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur J Neurosci* 25, 3091-3098.
- Lissau, I., Sorensen, T.I., 1994. Parental neglect during childhood and increased risk of obesity in young adulthood. *Lancet* 343, 324-327.
- Lister, R.G., 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther* 46, 321-340.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277, 1659-1662.

- Liu, X.J., Koski, K.G., 1997. Maternal dietary glucose modifies phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression in the kidney of newborn rats. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 187-190.
- Lowe, M.R., Kral, T.V., 2006. Stress-induced eating in restrained eaters may not be caused by stress or restraint. *Appetite* 46, 16-21.
- Lupien, S.J., Parent, S., Evans, A.C., Tremblay, R.E., Zelazo, P.D., Corbo, V., Pruessner, J.C., Seguin, J.R., 2011. Larger amygdala but no change in hippocampal volume in 10-year-old children exposed to maternal depressive symptomatology since birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14324-14329.
- Lutter, M., Nestler, E.J., 2009. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. *J Nutr* 139, 629-632.
- Lutz, P.E., Turecki, G., 2014. DNA methylation and childhood maltreatment: from animal models to human studies. *Neuroscience* 264, 142-156.
- Lynch, W.J., Mangini, L.D., Taylor, J.R., 2005. Neonatal isolation stress potentiates cocaine seeking behavior in adult male and female rats. *Neuropsychopharmacology* 30, 322-329.
- Lysaker, P.H., Davis, L.W., Gattton, M.J., Herman, S.M., 2005. Associations of anxiety-related symptoms with reported history of childhood sexual abuse in schizophrenia spectrum disorders. *J Clin Psychiatry* 66, 1279-1284.
- Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuena, A.R., Cinque, C., Van Reeth, O., 2003. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev* 27, 119-127.
- Maccari, S., Krugers, H.J., Morley-Fletcher, S., Szyf, M., Brunton, P.J., 2014. The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *J Neuroendocrinol* 26, 707-723.
- Maccari, S., Piazza, P.V., Kabbaj, M., Barbazanges, A., Simon, H., Le Moal, M., 1995. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J Neurosci* 15, 110-116.
- Macht, M., 2008. How emotions affect eating: A five-way model. *Appetite* 50, 1-11.
- Macht, M., Haupt, C., Ellgring, H., 2005. The perceived function of eating is changed during examination stress: a field study. *Eat Behav* 6, 109-112.
- Macht, M., Simons, G., 2000. Emotions and eating in everyday life. *Appetite* 35, 65-71.
- MacKay, J.C., James, J.S., Cayer, C., Kent, P., Anisman, H., Merali, Z., 2014. Protracted effects of juvenile stressor exposure are mitigated by access to palatable food. *PLoS One* 9, e96573.
- Macleod, J., Hickman, M., Bowen, E., Alati, R., Tilling, K., Smith, G.D., 2008. Parental drug use, early adversities, later childhood problems and children's use of tobacco and alcohol at age 10: birth cohort study. *Addiction* 103, 1731-1743.
- MacQueen, G.M., Ramakrishnan, K., Ratnasingan, R., Chen, B., Young, L.T., 2003. Desipramine treatment reduces the long-term behavioural and neurochemical sequelae of early-life maternal separation. *Int J Neuropsychopharmacol* 6, 391-396.

- Macri, S., Mason, G.J., Wurbel, H., 2004. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. *European Journal of Neuroscience* 20, 1017-1024.
- Macri, S., Wurbel, H., 2006. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: A critical review of the maternal mediation hypothesis. *Hormones and Behavior* 50, 667-680.
- Malter Cohen, M., Jing, D., Yang, R.R., Tottenham, N., Lee, F.S., Casey, B.J., 2013. Early-life stress has persistent effects on amygdala function and development in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 18274-18278.
- Maniam, J., Morris, M.J., 2010a. Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet. *Behav Brain Res* 208, 72-79.
- Maniam, J., Morris, M.J., 2010b. Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology* 35, 717-728.
- Maniam, J., Morris, M.J., 2010c. Voluntary exercise and palatable high-fat diet both improve behavioural profile and stress responses in male rats exposed to early life stress: role of hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* 35, 1553-1564.
- Marais, L., van Rensburg, S.J., van Zyl, J.M., Stein, D.J., Daniels, W.M., 2008. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res* 61, 106-112.
- Marcolin Mde, L., Benitz Ade, N., Arcego, D.M., Noschang, C., Krolow, R., Dalmaz, C., 2012. Effects of early life interventions and palatable diet on anxiety and on oxidative stress in young rats. *Physiol Behav* 106, 491-498.
- Markus, R., Panhuysen, G., Tuiten, A., Koppeschaar, H., 2000. Effects of food on cortisol and mood in vulnerable subjects under controllable and uncontrollable stress. *Physiol Behav* 70, 333-342.
- Martin, D.S., Walsh, M., Miller, A.M., Skerrett, H.E., Byrne, P., Mandel, A., Bolton, A.E., Lynch, M.A., 2009. A novel phospholipid-based drug formulation, VP025, modulates age- and LPS-induced microglial activity in the rat. *Neuroimmunomodulation* 16, 400-410.
- Mason, S.M., Flint, A.J., Field, A.E., Austin, S.B., Rich-Edwards, J.W., 2013. Abuse victimization in childhood or adolescence and risk of food addiction in adult women. *Obesity (Silver Spring)* 21, E775-781.
- Matthews, K., Dalley, J.W., Matthews, C., Tsai, T.H., Robbins, T.W., 2001. Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain. *Synapse* 40, 1-10.
- Mayer, E.A., Thompson, W.G., Dent, J., 1999. Irritable bowel syndrome: diagnosis, subgrouping, management, and clinical trial design. Introduction. *Am J Med* 107, 1S-4S.
- McCauley, J., Kern, D.E., Kolodner, K., Dill, L., Schroeder, A.F., DeChant, H.K., Ryden, J., Derogatis, L.R., Bass, E.B., 1997. Clinical characteristics of women with a history of childhood abuse: unhealed wounds. *JAMA* 277, 1362-1368.

- McEwen, B.S., 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87, 873-904.
- McGowan, P.O., Sasaki, A., D'Alessio, A.C., Dymov, S., Labonte, B., Szyf, M., Turecki, G., Meaney, M.J., 2009. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* 12, 342-348.
- McIntosh, J., Anisman, H., Merali, Z., 1999. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res* 113, 97-106.
- Mckay, J.A., Mathers, J.C., 2011. Diet induced epigenetic changes and their implications for health. *Acta Physiol* 202, 103-118.
- McMillen, I.C., Robinson, J.S., 2005. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85, 571-633.
- Meaney, M.J., 2001. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 24, 1161-1192.
- Meaney, M.J., Brake, W., Gratton, A., 2002. Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? *Psychoneuroendocrinology* 27, 127-138.
- Meaney, M.J., Mitchell, J.B., Aitken, D.H., Bhatnagar, S., Bodnoff, S.R., Iny, L.J., Sarrieau, A., 1991. The Effects of Neonatal Handling on the Development of the Adrenocortical-Response to Stress - Implications for Neuropathology and Cognitive Deficits in Later Life. *Psychoneuroendocrinology* 16, 85-103.
- Meaney, M.J., Szyf, M., 2005. Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity? *Trends Neurosci* 28, 456-463.
- Meerlo, P., Overkamp, G.J., Daan, S., Van Den Hoofdakker, R.H., Koolhaas, J.M., 1996. Changes in Behaviour and Body Weight Following a Single or Double Social Defeat in Rats. *Stress* 1, 21-32.
- Mehta, M.A., Golembo, N.I., Nosarti, C., Colvert, E., Mota, A., Williams, S.C., Rutter, M., Sonuga-Barke, E.J., 2009. Amygdala, hippocampal and corpus callosum size following severe early institutional deprivation: the English and Romanian Adoptees study pilot. *J Child Psychol Psychiatry* 50, 943-951.
- Meyer, B.J., Mann, N.J., Lewis, J.L., Milligan, G.C., Sinclair, A.J., Howe, P.R.C., 2003. Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 38, 391-398.
- Meyer, J.S., 1985. Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. *Physiol Rev* 65, 946-1020.
- Michaels, C.C., Easterling, K.W., Holtzman, S.G., 2007. Maternal separation alters ICSS responding in adult male and female rats, but morphine and naltrexone have little affect on that behavior. *Brain Res Bull* 73, 310-318.
- Michopoulos, V., Reding, K.M., Wilson, M.E., Toufexis, D., 2012. Social subordination impairs hypothalamic-pituitary-adrenal function in female rhesus monkeys. *Horm Behav* 62, 389-399.

- Midei, A.J., Matthews, K.A., Chang, Y.F., Bromberger, J.T., 2013. Childhood physical abuse is associated with incident metabolic syndrome in mid-life women. *Health Psychol* 32, 121-127.
- Miki, T., Liu, J.Q., Ohta, K., Suzuki, S., Kusaka, T., Warita, K., Yokoyama, T., Jamal, M., Ueki, M., Yakura, T., Tamai, M., Sumitani, K., Hosomi, N., Takeuchi, Y., 2013. Early postnatal maternal separation causes alterations in the expression of beta3-adrenergic receptor in rat adipose tissue suggesting long-term influence on obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 442, 68-71.
- Miller, G.E., Chen, E., Fok, A.K., Walker, H., Lim, A., Nicholls, E.F., Cole, S., Kobor, M.S., 2009. Low early-life social class leaves a biological residue manifested by decreased glucocorticoid and increased proinflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14716-14721.
- Million, M., Wang, L., Wang, Y., Adelson, D.W., Yuan, P.Q., Maillot, C., Coutinho, S.V., McRoberts, J.A., Bayati, A., Mattsson, H., Wu, V., Wei, J.Y., Rivier, J., Vale, W., Mayer, E.A., Tache, Y., 2006. CRF2 receptor activation prevents colorectal distension induced visceral pain and spinal ERK1/2 phosphorylation in rats. *Gut* 55, 172-181.
- Minni, A.M., de Medeiros, G.F., Helbling, J.C., Duittoz, A., Marissal-Arvy, N., Foury, A., De Smedt-Peyrusse, V., Pallet, V., Moisan, M.P., 2014. Role of corticosteroid binding globulin in emotional reactivity sex differences in mice. *Psychoneuroendocrinology* 50C, 252-263.
- Mirescu, C., Peters, J.D., Gould, E., 2004. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci* 7, 841-846.
- Mitra, A., Alvers, K.M., Crump, E.M., Rowland, N.E., 2009. Effect of high-fat diet during gestation, lactation, or postweaning on physiological and behavioral indexes in borderline hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R20-28.
- Mitra, A., Crump, E.M., Alvers, K.M., Robertson, K.L., Rowland, N.E., 2011. Effect of high-fat diet on stress responsiveness in borderline hypertensive rats. *Stress* 14, 42-52.
- Moffett, M.C., Vicentic, A., Kozel, M., Plotsky, P., Francis, D.D., Kuhar, M.J., 2007. Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. *Biochem Pharmacol* 73, 321-330.
- Monroy, E., Hernandez-Torres, E., Flores, G., 2010. Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *J Chem Neuroanat* 40, 93-101.
- Morgan, K.N., Thayer, J.E., Frye, C.A., 1999. Prenatal stress suppresses rat pup ultrasonic vocalization and myoclonic twitching in response to separation. *Developmental Psychobiology* 34, 205-215.
- Morrison, W.R., Smith, L.M., 1964. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol. *J Lipid Res* 5, 600-608.
- Mourlon, V., Baudin, A., Blanc, O., Lauber, A., Giros, B., Naudon, L., Dauge, V., 2010. Maternal deprivation induces depressive-like behaviours only in female rats. *Behav Brain Res* 213, 278-287.

- Moussaoui, N., Braniste, V., Ait-Belgnaoui, A., Gabanou, M., Sekkal, S., Olier, M., Theodorou, V., Martin, P.G., Houdeau, E., 2014. Changes in intestinal glucocorticoid sensitivity in early life shape the risk of epithelial barrier defect in maternal-deprived rats. *PLoS One* 9, e88382.
- Muhammad, A., Carroll, C., Kolb, B., 2012. Stress during development alters dendritic morphology in the nucleus accumbens and prefrontal cortex. *Neuroscience* 216, 103-109.
- Mullen, P.E., Martin, J.L., Anderson, J.C., Romans, S.E., Herbison, G.P., 1996. The long-term impact of the physical, emotional, and sexual abuse of children: a community study. *Child Abuse Negl* 20, 7-21.
- Myles, I.A., Fontecilla, N.M., Janelins, B.M., Vithayathil, P.J., Segre, J.A., Datta, S.K., 2013. Parental dietary fat intake alters offspring microbiome and immunity. *J Immunol* 191, 3200-3209.
- Naef, L., Moquin, L., Dal Bo, G., Giros, B., Gratton, A., Walker, C.D., 2011. Maternal high-fat intake alters presynaptic regulation of dopamine in the nucleus accumbens and increases motivation for fat rewards in the offspring. *Neuroscience* 176, 225-236.
- Naudon, L., Piscitelli, F., Giros, B., Di Marzo, V., Dauge, V., 2013. Possible involvement of endocannabinoids in the increase of morphine consumption in maternally deprived rat. *Neuropharmacology* 65, 193-199.
- Nederhof, E., Schmidt, M.V., 2012. Mismatch or cumulative stress: toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiol Behav* 106, 691-700.
- Nelson, E.D., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., 2008. Activity-dependent suppression of miniature neurotransmission through the regulation of DNA methylation. *J Neurosci* 28, 395-406.
- Nemeroff, C.B., Osbahr, A.J., 3rd, Bissette, G., Jahnke, G., Lipton, M.A., Prange, A.J., 1978. Cholecystokinin inhibits tail pinch-induced eating in rats. *Science* 200, 793-794.
- Newman, E., O'Connor, D.B., Conner, M., 2007. Daily hassles and eating behaviour: The role of cortisol reactivity status. *Psychoneuroendocrinology* 32, 125-132.
- Newport, D.J., Wilcox, M.M., Stowe, Z.N., 2002. Maternal depression: a child's first adverse life event. *Semin Clin Neuropsychiatry* 7, 113-119.
- Nguyen, D.M., El-Serag, H.B., 2010. The epidemiology of obesity. *Gastroenterol Clin North Am* 39, 1-7.
- Niculescu, M.D., Lupu, D.S., 2009. High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci* 27, 627-633.
- Nishi, M., Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., 2014. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci* 8, 166.
- Noirot, E., 1972. Ultrasounds and maternal behavior in small rodents. *Dev Psychobiol* 5, 371-387.
- Noll, J.G., Zeller, M.H., Trickett, P.K., Putnam, F.W., 2007. Obesity risk for female victims of childhood sexual abuse: a prospective study. *Pediatrics* 120, e61-67.

- Norman, R.M., Malla, A.K., 1994. A prospective study of daily stressors and symptomatology in schizophrenic patients. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 29, 244-249.
- O'Mahony, S., Chua, A.S., Quigley, E.M., Clarke, G., Shanahan, F., Keeling, P.W., Dinan, T.G., 2008. Evidence of an enhanced central 5HT response in irritable bowel syndrome and in the rat maternal separation model. *Neurogastroenterol Motil* 20, 680-688.
- O'Mahony, S.M., Marchesi, J.R., Scully, P., Codling, C., Ceolho, A.M., Quigley, E.M., Cryan, J.F., Dinan, T.G., 2009. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biol Psychiatry* 65, 263-267.
- Oberlander, T.F., Weinberg, J., Papsdorf, M., Grunau, R., Misri, S., Devlin, A.M., 2008. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics* 3, 97-106.
- Ohman, L., Simren, M., 2010. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7, 163-173.
- Ohta, K., Miki, T., Warita, K., Suzuki, S., Kusaka, T., Yakura, T., Liu, J.Q., Tamai, M., Takeuchi, Y., 2014. Prolonged maternal separation disturbs the serotonergic system during early brain development. *Int J Dev Neurosci* 33, 15-21.
- Oliver, G., Wardle, J., 1999. Perceived effects of stress on food choice. *Physiology & Behavior* 66, 511-515.
- Ong, Z.Y., Muhlhausler, B.S., 2011. Maternal "junk-food" feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB J* 25, 2167-2179.
- Oomura, Y., Nakamura, T., Sugimori, M., Yamada, Y., 1975. Effect of free fatty acid on the rat lateral hypothalamic neurons. *Physiol Behav* 14, 483-486.
- Ortolani, D., Oyama, L.M., Ferrari, E.M., Melo, L.L., Spadari-Bratfisch, R.C., 2011. Effects of comfort food on food intake, anxiety-like behavior and the stress response in rats. *Physiol Behav* 103, 487-492.
- Pace, T.W., Mletzko, T.C., Alagbe, O., Musselman, D.L., Nemeroff, C.B., Miller, A.H., Heim, C.M., 2006. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. *Am J Psychiatry* 163, 1630-1633.
- Page, K.C., Jones, E.K., Anday, E.K., 2014. Maternal and postweaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 306, R527-537.
- Park, H.R., Park, M., Choi, J., Park, K.Y., Chung, H.Y., Lee, J., 2010. A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett* 482, 235-239.
- Parks, E.P., Kumanyika, S., Moore, R.H., Stettler, N., Wrotniak, B.H., Kazak, A., 2012. Influence of stress in parents on child obesity and related behaviors. *Pediatrics* 130, e1096-1104.



- Pascoe, W.S., Smythe, G.A., Storlien, L.H., 1991. Enhanced responses to stress induced by fat-feeding in rats: relationship between hypothalamic noradrenaline and blood glucose. *Brain Res* 550, 192-196.
- Patchev, V.K., Montkowski, A., Rouskova, D., Koranyi, L., Holsboer, F., Almeida, O.F., 1997. Neonatal treatment of rats with the neuroactive steroid tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) abolishes the behavioral and neuroendocrine consequences of adverse early life events. *J Clin Invest* 99, 962-966.
- Paternain, L., Martisova, E., Milagro, F.I., Ramirez, M.J., Martinez, J.A., Campion, J., 2012. Postnatal maternal separation modifies the response to an obesogenic diet in adulthood in rats. *Dis Model Mech* 5, 691-697.
- Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., Stanton, C., 2012. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. *J Nutr Metab* 2012, 539426.
- Paxinos, G., Watson, C., Pennisi, M., Topple, A., 1985. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods* 13, 139-143.
- Pecoraro, N., Reyes, F., Gomez, F., Bhargava, A., Dallman, M.F., 2004. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145, 3754-3762.
- Pedros, I., Petrov, D., Allgaier, M., Sureda, F., Barroso, E., Beas-Zarate, C., Auladell, C., Pallas, M., Vazquez-Carrera, M., Casadesus, G., Folch, J., Camins, A., 2014. Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842, 1556-1566.
- Pelcovitz, D., Kaplan, S., Goldenberg, B., Mandel, F., Lehane, J., Guarrera, J., 1994. Post-traumatic stress disorder in physically abused adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 33, 305-312.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14, 149-167.
- Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32, 421-431.
- Perrin, A.E., Simon, C., Hedelin, G., Arveiler, D., Schaffer, P., Schlienger, J.L., 2002. Ten-year trends of dietary intake in a middle-aged French population: relationship with educational level. *Eur J Clin Nutr* 56, 393-401.
- Perry, J.L., Carroll, M.E., 2008. The role of impulsive behavior in drug abuse. *Psychopharmacology (Berl)* 200, 1-26.
- Phelps, E.A., LeDoux, J.E., 2005. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron* 48, 175-187.
- Phipps, K., Barker, D.J., Hales, C.N., Fall, C.H., Osmond, C., Clark, P.M., 1993. Fetal growth and impaired glucose tolerance in men and women. *Diabetologia* 36, 225-228.
- Pickering, C., Gustafsson, L., Cebere, A., Nylander, I., Liljequist, S., 2006. Repeated maternal separation of male Wistar rats alters glutamate receptor expression in the hippocampus but not the prefrontal cortex. *Brain Res* 1099, 101-108.

- Plagemann, A., Harder, T., Kohlhoff, R., Rohde, W., Dorner, G., 1997. Overweight and obesity in infants of mothers with long-term insulin-dependent diabetes or gestational diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21, 451-456.
- Platt, K.M., Charnigo, R.J., Pearson, K.J., 2014. Adult offspring of high-fat diet-fed dams can have normal glucose tolerance and body composition. *J Dev Orig Health Dis* 5, 229-239.
- Ploj, K., Nylander, I., 2003. Long-term effects on brain opioid and opioid receptor like-1 receptors after short periods of maternal separation in rats. *Neurosci Lett* 345, 195-197.
- Ploj, K., Roman, E., Nylander, I., 2003a. Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. *Neuroscience* 121, 787-799.
- Ploj, K., Roman, E., Nylander, I., 2003b. Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male wistar rats. *Neuroscience* 121, 787-799.
- Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 18, 195-200.
- Pollard, T.M., Steptoe, A., Canaan, L., Davies, G.J., Wardle, J., 1995. Effects of academic examination stress on eating behavior and blood lipid levels. *Int J Behav Med* 2, 299-320.
- Pollitt, R.A., Kaufman, J.S., Rose, K.M., Diez-Roux, A.V., Zeng, D., Heiss, G., 2007. Early-life and adult socioeconomic status and inflammatory risk markers in adulthood. *Eur J Epidemiol* 22, 55-66.
- Poon, K., Barson, J.R., Fagan, S.E., Leibowitz, S.F., 2012. Developmental changes in embryonic hypothalamic neurons during prenatal fat exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303, E432-441.
- Popkin, B.M., 2001. Nutrition in transition: the changing global nutrition challenge. *Asia Pac J Clin Nutr* 10 Suppl, S13-18.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.
- Prasad, A., Prasad, C., 1996. Short-term consumption of a diet rich in fat decreases anxiety response in adult male rats. *Physiol Behav* 60, 1039-1042.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463, 3-33.
- Pryce, C.R., Bettschen, D., Nanz-Bahr, N.I., Feldon, J., 2003. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on conditioned stimulus, context, and spatial learning and memory in adult rats. *Behav Neurosci* 117, 883-893.
- Purcell, R.H., Sun, B., Pass, L.L., Power, M.L., Moran, T.H., Tamashiro, K.L., 2011. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav* 104, 474-479.
- Radtke, K.M., Ruf, M., Gunter, H.M., Dohrmann, K., Schauer, M., Meyer, A., Elbert, T., 2011. Transgenerational impact of intimate partner violence on methylation in the promoter of the glucocorticoid receptor. *Transl Psychiatry* 1, e21.

- Raison, C.L., Capuron, L., Miller, A.H., 2006. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 27, 24-31.
- Rao, U., Chen, L.A., Bidesi, A.S., Shad, M.U., Thomas, M.A., Hammen, C.L., 2010. Hippocampal changes associated with early-life adversity and vulnerability to depression. *Biol Psychiatry* 67, 357-364.
- Read, J., van Os, J., Morrison, A.P., Ross, C.A., 2005. Childhood trauma, psychosis and schizophrenia: a literature review with theoretical and clinical implications. *Acta Psychiatr Scand* 112, 330-350.
- Reus, G.Z., Stringari, R.B., Ribeiro, K.F., Cipriano, A.L., Panizzutti, B.S., Stertz, L., Lersch, C., Kapczinski, F., Quevedo, J., 2011. Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain. *Neurochem Res* 36, 460-466.
- Revest, J.M., Dupret, D., Koehl, M., Funk-Reiter, C., Grosjean, N., Piazza, P.V., Abrous, D.N., 2009. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry* 14, 959-967.
- Ricart-Jane, D., Rodriguez-Sureda, V., Benavides, A., Peinado-Onsurbe, J., Lopez-Tejero, M.D., Llobera, M., 2002. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. *Metabolism* 51, 925-931.
- Rich-Edwards, J.W., Spiegelman, D., Lividoti Hibert, E.N., Jun, H.J., Todd, T.J., Kawachi, I., Wright, R.J., 2010. Abuse in childhood and adolescence as a predictor of type 2 diabetes in adult women. *Am J Prev Med* 39, 529-536.
- Richardson, A.S., Dietz, W.H., Gordon-Larsen, P., 2014. The association between childhood sexual and physical abuse with incident adult severe obesity across 13 years of the National Longitudinal Study of Adolescent Health. *Pediatr Obes* 9, 351-361.
- Rivarola, M.A., Suarez, M.M., 2009. Early maternal separation and chronic variable stress in adulthood changes the neural activity and the expression of glucocorticoid receptor in limbic structures. *Int J Dev Neurosci* 27, 567-574.
- Roceri, M., Cirulli, F., Pessina, C., Peretto, P., Racagni, G., Riva, M.A., 2004. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiatry* 55, 708-714.
- Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Ellenbroek, B.A., Riva, M.A., 2002. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry* 7, 609-616.
- Rohsenow, D.J., Corbett, R., Devine, D., 1988. Molested as children: a hidden contribution to substance abuse? *J Subst Abuse Treat* 5, 13-18.
- Rolls, B.A., Gurr, M.I., Vanduijvenvoorde, P.M., Rolls, B.J., Rowe, E.A., 1986. Lactation in Lean and Obese Rats - Effect of Cafeteria Feeding and of Dietary Obesity on Milk-Composition. *Physiology & Behavior* 38, 185-190.
- Roman, E., Gustafsson, L., Hyytia, P., Nylander, I., 2005. Short and prolonged periods of maternal separation and voluntary ethanol intake in male and female ethanol-preferring AA and ethanol-avoiding ANA rats. *Alcohol Clin Exp Res* 29, 591-601.

- Roman, E., Nylander, I., 2005. The impact of emotional stress early in life on adult voluntary ethanol intake-results of maternal separation in rats. *Stress-the International Journal on the Biology of Stress* 8, 157-174.
- Rosenfeld, P., Ekstrand, J., Olson, E., Suchecki, D., Levine, S., 1993. Maternal regulation of adrenocortical activity in the infant rat: effects of feeding. *Dev Psychobiol* 26, 261-277.
- Rosenfeld, P., Wetmore, J.B., Levine, S., 1992. Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweanling rats. *Physiol Behav* 52, 787-791.
- Rosztoczy, A., Fioramonti, J., Jarmay, K., Barreau, F., Wittmann, T., Bueno, L., 2003. Influence of sex and experimental protocol on the effect of maternal deprivation on rectal sensitivity to distension in the adult rat. *Neurogastroenterol Motil* 15, 679-686.
- Roth, T.L., Lubin, F.D., Funk, A.J., Sweatt, J.D., 2009. Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol Psychiatry* 65, 760-769.
- Roth, T.L., Sweatt, J.D., 2011. Epigenetic marking of the BDNF gene by early-life adverse experiences. *Horm Behav* 59, 315-320.
- Ruedi-Bettschen, D., Pedersen, E.M., Feldon, J., Pryce, C.R., 2005a. Early deprivation under specific conditions leads to reduced interest in reward in adulthood in Wistar rats. *Behav Brain Res* 156, 297-310.
- Ruedi-Bettschen, D., Pedersen, E.M., Feldon, J., Pryce, C.R., 2005b. Early deprivation under specific conditions leads to reduced interest in reward in adulthood in Wistar rats. *Behavioural Brain Research* 156, 297-310.
- Rybkin, I.I., Zhou, Y., Volaufova, J., Smagin, G.N., Ryan, D.H., Harris, R.B., 1997. Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day. *Am J Physiol* 273, R1612-1622.
- Ryu, V., Lee, J.H., Yoo, S.B., Gu, X.F., Moon, Y.W., Jahng, J.W., 2008. Sustained hyperphagia in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. *Int J Obes (Lond)* 32, 1355-1362.
- Ryu, V., Yoo, S.B., Kang, D.W., Lee, J.H., Jahng, J.W., 2009. Post-weaning isolation promotes food intake and body weight gain in rats that experienced neonatal maternal separation. *Brain Res* 1295, 127-134.
- Saito, Y.A., Schoenfeld, P., Locke, G.R., 3rd, 2002. The epidemiology of irritable bowel syndrome in North America: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 97, 1910-1915.
- Salmon, P., Skaife, K., Rhodes, J., 2003. Abuse, dissociation, and somatization in irritable bowel syndrome: towards an explanatory model. *J Behav Med* 26, 1-18.
- Salzberg, M., Kumar, G., Supit, L., Jones, N.C., Morris, M.J., Rees, S., O'Brien, T.J., 2007. Early postnatal stress confers enduring vulnerability to limbic epileptogenesis. *Epilepsia* 48, 2079-2085.
- Samaco, R.C., Mandel-Brehm, C., McGraw, C.M., Shaw, C.A., McGill, B.E., Zoghbi, H.Y., 2012. Crh and Oprm1 mediate anxiety-related behavior and social approach in a mouse model of MECP2 duplication syndrome. *Nat Genet* 44, 206-211.

- Sanchez-Castillo, C.P., Velasquez-Monroy, O., Lara-Esqueda, A., Berber, A., Sepulveda, J., Tapia-Conyer, R., James, W.P., 2005. Diabetes and hypertension increases in a society with abdominal obesity: results of the Mexican National Health Survey 2000. *Public Health Nutr* 8, 53-60.
- Sanchez, M.M., Ladd, C.O., Plotsky, P.M., 2001. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Dev Psychopathol* 13, 419-449.
- Sanchis-Segura, C., Spanagel, R., 2006. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 11, 2-38.
- Sapolsky, R.M., Meaney, M.J., 1986. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res* 396, 64-76.
- Sasaki, A., de Vega, W., Sivanathan, S., St-Cyr, S., McGowan, P.O., 2014. Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. *Neuroscience* 272, 92-101.
- Sasaki, A., de Vega, W.C., St-Cyr, S., Pan, P., McGowan, P.O., 2013. Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. *Neuroscience* 240, 1-12.
- Schenkel, L.S., Spaulding, W.D., DiLillo, D., Silverstein, S.M., 2005. Histories of childhood maltreatment in schizophrenia: relationships with premorbid functioning, symptomatology, and cognitive deficits. *Schizophr Res* 76, 273-286.
- Schloesser, R.J., Manji, H.K., Martinowich, K., 2009. Suppression of adult neurogenesis leads to an increased hypothalamo-pituitary-adrenal axis response. *Neuroreport* 20, 553-557.
- Schmahl, C.G., Vermetten, E., Elzinga, B.M., Douglas Bremner, J., 2003. Magnetic resonance imaging of hippocampal and amygdala volume in women with childhood abuse and borderline personality disorder. *Psychiatry Res* 122, 193-198.
- Schmidt, M.V., Levine, S., Alam, S., Harbich, D., Sterlemann, V., Ganea, K., de Kloet, E.R., Holsboer, F., Muller, M.B., 2006. Metabolic signals modulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. *Journal of Neuroendocrinology* 18, 865-874.
- Schwetz, I., McRoberts, J.A., Coutinho, S.V., Bradesi, S., Gale, G., Fanselow, M., Million, M., Ohning, G., Tache, Y., Plotsky, P.M., Mayer, E.A., 2005. Corticotropin-releasing factor receptor 1 mediates acute and delayed stress-induced visceral hyperalgesia in maternally separated Long-Evans rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G704-712.
- Selye, H., 1976. The stress concept. *Can Med Assoc J* 115, 718.
- Sessler, A.M., Kaur, N., Palta, J.P., Ntambi, J.M., 1996. Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 271, 29854-29858.
- Shahrokh, D.K., Zhang, T.Y., Diorio, J., Gratton, A., Meaney, M.J., 2010. Oxytocin-dopamine interactions mediate variations in maternal behavior in the rat. *Endocrinology* 151, 2276-2286.

- Shalev, U., Kafkafi, N., 2002. Repeated maternal separation does not alter sucrose-reinforced and open-field behaviors. *Pharmacol Biochem Be* 73, 115-122.
- Shankar, K., Harrell, A., Liu, X., Gilchrist, J.M., Ronis, M.J., Badger, T.M., 2008. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R528-538.
- Sharma, S., Fulton, S., 2013. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int J Obes (Lond)* 37, 382-389.
- Shenderov, B.A., 2012. Gut indigenous microbiota and epigenetics. *Microb Ecol Health Dis* 23.
- Shirtcliff, E.A., Coe, C.L., Pollak, S.D., 2009. Early childhood stress is associated with elevated antibody levels to herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2963-2967.
- Simon, R., Lam, A., Li, M.C., Ngan, M., Menenzes, S., Zhao, Y., 2007. Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. *Cancer Inform* 3, 11-17.
- Simopoulos, A.P., 2011. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol Neurobiol* 44, 203-215.
- Snyder, J.S., Hong, N.S., McDonald, R.J., Wojtowicz, J.M., 2005. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130, 843-852.
- Soderholm, J.D., Yates, D.A., Gareau, M.G., Yang, P.C., MacQueen, G., Perdue, M.H., 2002. Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G1257-1263.
- Solas, M., Aisa, B., Mugueta, M.C., Del Rio, J., Tordera, R.M., Ramirez, M.J., 2010. Interactions between age, stress and insulin on cognition: implications for Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 35, 1664-1673.
- Sommer, C., 2004. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. *Mol Neurobiol* 30, 117-125.
- Sousa, V.C., Vital, J., Costenla, A.R., Batalha, V.L., Sebastiao, A.M., Ribeiro, J.A., Lopes, L.V., 2014. Maternal separation impairs long term-potentiation in CA1-CA3 synapses and hippocampal-dependent memory in old rats. *Neurobiol Aging* 35, 1680-1685.
- Spencer, S.J., 2013. Perinatal programming of neuroendocrine mechanisms connecting feeding behavior and stress. *Front Neurosci* 7, 109.
- Stein, M.B., Walker, J.R., Anderson, G., Hazen, A.L., Ross, C.A., Eldridge, G., Forde, D.R., 1996. Childhood physical and sexual abuse in patients with anxiety disorders and in a community sample. *Am J Psychiatry* 153, 275-277.
- Sterley, T.L., Howells, F.M., Russell, V.A., 2013. Evidence for reduced tonic levels of GABA in the hippocampus of an animal model of ADHD, the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res* 1541, 52-60.
- Stillwell, W., Shaikh, S.R., Zerouga, M., Siddiqui, R., Wassall, S.R., 2005. Docosaehaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev* 45, 559-579.

- Stranahan, A.M., Norman, E.D., Lee, K., Cutler, R.G., Telljohann, R.S., Egan, J.M., Mattson, M.P., 2008. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 18, 1085-1088.
- Strandvik, B., 2011. The omega-6/omega-3 ratio is of importance! *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 85, 405-406.
- Suchecki, D., Mozaffarian, D., Gross, G., Rosenfeld, P., Levine, S., 1993a. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology* 57, 204-212.
- Suchecki, D., Rosenfeld, P., Levine, S., 1993b. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res* 75, 185-192.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.N., Kubo, C., Koga, Y., 2004. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 558, 263-275.
- Sullivan, E.L., Grayson, B., Takahashi, D., Robertson, N., Maier, A., Bethea, C.L., Smith, M.S., Coleman, K., Grove, K.L., 2010. Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. *J Neurosci* 30, 3826-3830.
- Sullivan, E.L., Smith, M.S., Grove, K.L., 2011. Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology* 93, 1-8.
- Suri, D., Veenit, V., Sarkar, A., Thiagarajan, D., Kumar, A., Nestler, E.J., Galande, S., Vaidya, V.A., 2013. Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition. *Biol Psychiatry* 73, 658-666.
- Suter, M.A., Ma, J., Vuguin, P.M., Hartil, K., Fiallo, A., Harris, R.A., Charron, M.J., Aagaard, K.M., 2014. In utero exposure to a maternal high-fat diet alters the epigenetic histone code in a murine model. *Am J Obstet Gynecol* 210, 463 e461-463 e411.
- Swift, W., Copeland, J., Hall, W., 1996. Characteristics of women with alcohol and other drug problems: findings of an Australian national survey. *Addiction* 91, 1141-1150.
- Tamashiro, K.L., Terrillion, C.E., Hyun, J., Koenig, J.I., Moran, T.H., 2009. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* 58, 1116-1125.
- Tannenbaum, B.M., Brindley, D.N., Tannenbaum, G.S., Dallman, M.F., McArthur, M.D., Meaney, M.J., 1997. High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *Am J Physiol* 273, E1168-1177.
- Tarullo, A.R., Gunnar, M.R., 2006. Child maltreatment and the developing HPA axis. *Horm Behav* 50, 632-639.
- Taylor, P.D., Poston, L., 2007. Developmental programming of obesity in mammals. *Exp Physiol* 92, 287-298.

- Taylor, S.E., Lehman, B.J., Kiefe, C.I., Seeman, T.E., 2006. Relationship of early life stress and psychological functioning to adult C-reactive protein in the coronary artery risk development in young adults study. *Biol Psychiatry* 60, 819-824.
- Thiel, G., Ekici, M., Rossler, O.G., 2014. RE-1 silencing transcription factor (REST): a regulator of neuronal development and neuronal/endocrine function. *Cell Tissue Res.*
- Tjong, Y.W., Ip, S.P., Lao, L., Wu, J., Fong, H.H., Sung, J.J., Berman, B., Che, C.T., 2010. Neonatal maternal separation elevates thalamic corticotrophin releasing factor type 1 receptor expression response to colonic distension in rat. *Neuro Endocrinol Lett* 31, 215-220.
- Toigo, E.V., Diehl, L.A., Ferreira, A.G.K., Mackendanz, V., Krolow, R., Benitz, A.N.D., Noschang, C., Huffell, A.P., Silveira, P.P., Wyse, A.T.S., Dalmaz, C., 2012. Maternal Depression Model: Long-Lasting Effects on the Mother Following Separation from Pups. *Neurochemical Research* 37, 126-133.
- Tomiya, A.J., Dallman, M.F., Epel, E.S., 2011. Comfort food is comforting to those most stressed: evidence of the chronic stress response network in high stress women. *Psychoneuroendocrinology* 36, 1513-1519.
- Tomoda, A., Suzuki, H., Rabi, K., Sheu, Y.S., Polcari, A., Teicher, M.H., 2009. Reduced prefrontal cortical gray matter volume in young adults exposed to harsh corporal punishment. *Neuroimage* 47 Suppl 2, T66-71.
- Tottenham, N., Sheridan, M.A., 2009. A review of adversity, the amygdala and the hippocampus: a consideration of developmental timing. *Front Hum Neurosci* 3, 68.
- Tozuka, Y., Kumon, M., Wada, E., Onodera, M., Mochizuki, H., Wada, K., 2010. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochem Int* 57, 235-247.
- Tozuka, Y., Wada, E., Wada, K., 2009. Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. *FASEB J* 23, 1920-1934.
- Trottier, G., Koski, K.G., Brun, T., Toufexis, D.J., Richard, D., Walker, C.D., 1998. Increased fat intake during lactation modifies hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness in developing rat pups: a possible role for leptin. *Endocrinology* 139, 3704-3711.
- Tryon, M.S., Carter, C.S., Decant, R., Laugero, K.D., 2013a. Chronic stress exposure may affect the brain's response to high calorie food cues and predispose to obesogenic eating habits. *Physiol Behav* 120, 233-242.
- Tryon, M.S., DeCant, R., Laugero, K.D., 2013b. Having your cake and eating it too: a habit of comfort food may link chronic social stress exposure and acute stress-induced cortisol hypo-responsiveness. *Physiol Behav* 114-115, 32-37.
- Tyrka, A.R., Price, L.H., Marsit, C., Walters, O.C., Carpenter, L.L., 2012. Childhood adversity and epigenetic modulation of the leukocyte glucocorticoid receptor: preliminary findings in healthy adults. *PLoS One* 7, e30148.
- Uchida, S., Hara, K., Kobayashi, A., Funato, H., Hobara, T., Otsuki, K., Yamagata, H., McEwen, B.S., Watanabe, Y., 2010. Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene



- transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. *J Neurosci* 30, 15007-15018.
- Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P., 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10, 397-409.
- Ulrich-Lai, Y.M., Ostrander, M.M., Thomas, I.M., Packard, B.A., Furay, A.R., Dolgas, C.M., Van Hooren, D.C., Figueiredo, H.F., Mueller, N.K., Choi, D.C., Herman, J.P., 2007. Daily limited access to sweetened drink attenuates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis stress responses. *Endocrinology* 148, 1823-1834.
- Vaiserman, A.M., 2014. Epigenetic programming by early-life stress: Evidence from human populations. *Dev Dyn*.
- Vallee, M., MacCari, S., Dellu, F., Simon, H., Le Moal, M., Mayo, W., 1999. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur J Neurosci* 11, 2906-2916.
- Vallee, M., Mayo, W., Dellu, F., LeMoal, M., Simon, H., Maccari, S., 1997. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: Correlation with stress-induced corticosterone secretion. *Journal of Neuroscience* 17, 2626-2636.
- Valles, A., Marti, O., Garcia, A., Armario, A., 2000. Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R1138-1144.
- van der Sande, M.A., Ceesay, S.M., Milligan, P.J., Nyan, O.A., Banya, W.A., Prentice, A., McAdam, K.P., Walraven, G.E., 2001. Obesity and undernutrition and cardiovascular risk factors in rural and urban Gambian communities. *Am J Public Health* 91, 1641-1644.
- van Harmelen, A.L., van Tol, M.J., van der Wee, N.J., Veltman, D.J., Aleman, A., Spinhoven, P., van Buchem, M.A., Zitman, F.G., Penninx, B.W., Elzinga, B.M., 2010. Reduced medial prefrontal cortex volume in adults reporting childhood emotional maltreatment. *Biol Psychiatry* 68, 832-838.
- van Strien, T., Ouwens, M.A., 2003. Counterregulation in female obese emotional eaters: Schachter, Goldman, and Gordon's (1968) test of psychosomatic theory revisited. *Eat Behav* 3, 329-340.
- Vazquez, D.M., 1998. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 23, 663-700.
- Vazquez, V., Giros, B., Dauge, V., 2006. Maternal deprivation specifically enhances vulnerability to opiate dependence. *Behav Pharmacol* 17, 715-724.
- Vazquez, V., Penit-Soria, J., Durand, C., Besson, M.J., Giros, B., Dauge, V., 2005. Maternal deprivation increases vulnerability to morphine dependence and disturbs the enkephalinergic system in adulthood. *J Neurosci* 25, 4453-4462.
- Veenema, A.H., Bredewold, R., Neumann, I.D., 2007. Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology* 32, 437-450.

- Venna, V.R., Deplanque, D., Allet, C., Belarbi, K., Hamdane, M., Bordet, R., 2009. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* 34, 199-211.
- Vermetten, E., Schmahl, C., Lindner, S., Loewenstein, R.J., Bremner, J.D., 2006. Hippocampal and amygdalar volumes in dissociative identity disorder. *Am J Psychiatry* 163, 630-636.
- Volpato, A.M., Schultz, A., Magalhaes-da-Costa, E., Correia, M.L., Aguilá, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., 2012. Maternal high-fat diet programs for metabolic disturbances in offspring despite leptin sensitivity. *Neuroendocrinology* 96, 272-284.
- Vucetic, Z., Kimmel, J., Totoki, K., Hollenbeck, E., Reyes, T.M., 2010. Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology* 151, 4756-4764.
- Vucetic, Z., Reyes, T.M., 2010. Central dopaminergic circuitry controlling food intake and reward: implications for the regulation of obesity. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2, 577-593.
- Vythilingam, M., Heim, C., Newport, J., Miller, A.H., Anderson, E., Bronen, R., Brummer, M., Staib, L., Vermetten, E., Charney, D.S., Nemeroff, C.B., Bremner, J.D., 2002. Childhood trauma associated with smaller hippocampal volume in women with major depression. *Am J Psychiatry* 159, 2072-2080.
- Wakeling, L.A., Ions, L.J., Ford, D., 2009. Could Sirt1-mediated epigenetic effects contribute to the longevity response to dietary restriction and be mimicked by other dietary interventions? *Age* 31, 327-341.
- Walf, A.A., Frye, C.A., 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2, 322-328.
- Walker, C.D., Naef, L., d'Asti, E., Long, H., Xu, Z., Moreau, A., Azeddine, B., 2008. Perinatal maternal fat intake affects metabolism and hippocampal function in the offspring: a potential role for leptin. *Ann N Y Acad Sci* 1144, 189-202.
- Wallis, D.J., Hetherington, M.M., 2004. Stress and eating: the effects of ego-threat and cognitive demand on food intake in restrained and emotional eaters. *Appetite* 43, 39-46.
- Walsh, M.R., Dunckley, H.G., Sinclair, J.M., Schiff, A.A., 1976. A test of the concept of "underlying depressive illness" in the treatment of anxiety states. *Curr Med Res Opin* 4, 340-345.
- Wang, A., Nie, W., Li, H., Hou, Y., Yu, Z., Fan, Q., Sun, R., 2014. Epigenetic upregulation of corticotrophin-releasing hormone mediates postnatal maternal separation-induced memory deficiency. *PLoS One* 9, e94394.
- Warden, C.H., Fisler, J.S., 2008. Comparisons of diets used in animal models of high-fat feeding. *Cell Metab* 7, 277-277.
- Weaver, I.C., Szyf, M., Meaney, M.J., 2002. From maternal care to gene expression: DNA methylation and the maternal programming of stress responses. *Endocr Res* 28, 699.
- Weiner, S.A., Toth, A.L., 2012. Epigenetics in social insects: a new direction for understanding the evolution of castes. *Genet Res Int* 2012, 609810.

- Welch, S.L., Fairburn, C.G., 1996. Childhood sexual and physical abuse as risk factors for the development of bulimia nervosa: a community-based case control study. *Child Abuse Negl* 20, 633-642.
- Whitaker, R.C., 2004. Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy. *Pediatrics* 114, e29-36.
- White, C.L., Pistell, P.J., Purpera, M.N., Gupta, S., Fernandez-Kim, S.O., Hise, T.L., Keller, J.N., Ingram, D.K., Morrison, C.D., Bruce-Keller, A.J., 2009a. Effects of high fat diet on Morris maze performance, oxidative stress, and inflammation in rats: contributions of maternal diet. *Neurobiol Dis* 35, 3-13.
- White, C.L., Purpera, M.N., Morrison, C.D., 2009b. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R1464-1472.
- Widmaier, E.P., Rosen, K., Abbott, B., 1992. Free fatty acids activate the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in rats. *Endocrinology* 131, 2313-2318.
- Wilber, A.A., Southwood, C.J., Wellman, C.L., 2009. Brief neonatal maternal separation alters extinction of conditioned fear and corticolimbic glucocorticoid and NMDA receptor expression in adult rats. *Dev Neurobiol* 69, 73-87.
- Wilber, A.A., Wellman, C.L., 2009. Neonatal maternal separation-induced changes in glucocorticoid receptor expression in posterior interpositus interneurons but not projection neurons predict deficits in adult eyeblink conditioning. *Neurosci Lett* 460, 214-218.
- Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., Muscat, R., 1987. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 93, 358-364.
- Woon, F.L., Hedges, D.W., 2008. Hippocampal and amygdala volumes in children and adults with childhood maltreatment-related posttraumatic stress disorder: a meta-analysis. *Hippocampus* 18, 729-736.
- Wright, T., Langley-Evans, S.C., Voigt, J.P., 2011. The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. *Physiol Behav* 103, 164-172.
- Yates, K.F., Sweat, V., Yau, P.L., Turchiano, M.M., Convit, A., 2012. Impact of metabolic syndrome on cognition and brain: a selected review of the literature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 2060-2067.
- Yehuda, S., 2003. Omega-6/omega-3 ratio and brain-related functions. *World Rev Nutr Diet* 92, 37-56.
- Yoo, S.B., Ryu, V., Park, E.Y., Kim, B.T., Kang, D.W., Lee, J.H., Jahng, J.W., 2011. The arcuate NPY, POMC, and CART expressions responding to food deprivation are exaggerated in young female rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuropeptides* 45, 343-349.
- Zeisel, S.H., 2006. The fetal origins of memory: the role of dietary choline in optimal brain development. *J Pediatr* 149, S131-136.
- Zellner, M.R., Ranaldi, R., 2006. Separation, motivation, and depression: Neonatal isolation reduces food-rewarded operant responding in rats. *Psychol Rec* 56, 371-386.

- Zhang, L.X., Levine, S., Dent, G., Zhan, Y., Xing, G., Okimoto, D., Kathleen Gordon, M., Post, R.M., Smith, M.A., 2002. Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 133, 1-11.
- Zhao, C., Deng, W., Gage, F.H., 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660.
- Zheng, J., Xiao, X., Zhang, Q., Yu, M., Xu, J., Wang, Z., 2014. Maternal high-fat diet modulates hepatic glucose, lipid homeostasis and gene expression in the PPAR pathway in the early life of offspring. *Int J Mol Sci* 15, 14967-14983.
- Zimmerberg, B., Kajunski, E.W., 2004. Sexually dimorphic effects of postnatal allopregnanolone on the development of anxiety behavior after early deprivation. *Pharmacol Biochem Behav* 78, 465-471.
- Zimmermann, M.B., 2007. The adverse effects of mild-to-moderate iodine deficiency during pregnancy and childhood: a review. *Thyroid* 17, 829-835.